

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**GENERACIÓN Y APLICACIÓN DE
ANTICUERPOS RECOMBINANTES
HUMANOS *IN VIVO***

David Sánchez Martín

Madrid, 2011

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**GENERACIÓN Y APLICACIÓN DE
ANTICUERPOS RECOMBINANTES
HUMANOS *IN VIVO***

David Sánchez Martín

Licenciado en Bioquímica

Licenciado en Biología

DIRECTOR: Dr. LUIS ÁLVAREZ VALLINA
HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO

El Dr. LUIS ÁLVAREZ VALLINA, Jefe Adjunto del Servicio de Inmunología y Jefe de la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid,

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado **Generación y aplicación de anticuerpos recombinantes *in vivo***, que presenta DAVID SÁNCHEZ MARTÍN para la obtención del GRADO DE DOCTOR por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizado bajo su dirección en la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid y reúne las condiciones de calidad, contenido y forma exigibles para ser presentado ante el tribunal correspondiente.

Para que conste a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Madrid a 24 de Mayo de 2011.

Dr. Víctor Calvo López

Tutor de Tesis

Profesor Titular

Departamento de Bioquímica

Universidad Autónoma de Madrid

Dr. Luis Álvarez Vallina

Director de Tesis

Esta Tesis Doctoral, realizada en la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro, ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (BIO2008-03233), por la Comunidad Autónoma de Madrid (S-BIO-0236-2006) y por la Unión Europea (SUDOE-FEDER IMMUNONET-SOE1/P1/E014)

David Sánchez Martín ha disfrutado de una beca de Formación de Personal Investigador en el marco del Plan Regional de Investigación e Innovación Tecnológica de la Comunidad Autónoma de Madrid. (FPI-000531).

A mis padres,

A Marcos,

A Aida

Agradecimientos

A Antonio y Rosa, incondicionales y solícitos desde los primeros pasos hasta la impresión de esta tesis. Gracias por el apoyo, por la dedicación, por los tápers, por el tiempo, por la paciencia, por el cariño, por las llamadas, por las correcciones, por los ánimos, por poneros siempre de mi parte, por las palabras de aliento, por la comprensión.

A Marcos, mi enano particular, por la fascinación mutua.

A la abuela Transy. Por ser un ejemplo de tesón y tenacidad. Por iniciarme a la ciencia con los jabones de verano. Y por los hornazos que me han mantenido estos últimos años. A Toñi, a Javier y a Toñi por enseñarme Madrid y por acogerme. Por su apoyo.

A mi director de tesis, Luis Álvarez Vallina, por la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Por la vigilante tutela, y por la confianza y libertad, por los jenízaros aberronchados, por la profusión de ideas y por el espíritu crítico.

A Ana, Emi, Sonia y toda la gente que nos rescata cuando naufragamos en esa vida real —fuera del laboratorio— tan llena de trámites, plazos, permisos, papeles, solicitudes, etc. Gracias por salvarnos, y, sobre todo, por hacerlo con una sonrisa. A Cristina, por esa combinación de artículos imposibles y de pinchos navideños. A Candelas, por su paciencia, por los pósters, por esos caramelos —que han sido, en más de una ocasión, el único sustento—. A Irene y Angelines, por esas broncas (siempre cariñosas) a las nueve de la tarde por pisar el suelo recién fregado. A María Luisa, por su genio y figura. A José, por esos ratos de animalario compartidos.

A Antonio, con quien algún día iré a Atapuerca; a Natalia, impresión de urgencia incluida; a Paloma, mi hematóloga preferida aunque no me llevase al Caribe; a María José, ¡¡qué paciencia tienes!! (¡¡Y qué fotos sacas!!); a Elvira; a Laura. A toda la gente de la planta baja, en especial a Laura, por esos ratos haciendo cortes y por esos chistes que compiten con los de la tercera. A los Bonis, nuestros vecinos que tan agradable hacían el zulo, y más aún hacen ahora la tercera. Por la música, aparatos, cotilleos, por los chis-

tes y por la envidia que dais con esa cafetera... cualquier día de estos la socializamos. A José Miguel, Javi, Mercedes, Josefina, Alberto, Cristina, Irene, Coral, Bea, Marta, Gemma, Vanesa,...

A David, llamándote así no podías ser sino un tipo cabal (en concreto, en su cuarta acepción) y, en cambio, mírate... ¡Todo un “canalla”! A Elisa. A Manuela. A Kelly, por la inocencia que aún albergas, por tu alegría y por tu risa, por ser del Madrid (o de Cristiano), porque algún día me llevarás a Perú (aunque sólo sea para que sienta en mis carnes el látigo del idioma).

A mis compañeros del labo. Esa gente con la que uno acaba pasando tantas horas al día y, a pesar de eso, no sólo te siguen aguantando sino que, a veces, ¡incluso te dan masajes! A Irene Molina, compañera de poyata, y de titulaciones —y de baile no, porque no me atrevo—; a Patri, por la ludopatía compartida (¿dónde han quedado esas tardes de mus de la facultad?), por el tabaco que un día dejarás; a Nuria, charrita de pro y eso lo resume todo; a Laura, por esas curiosidades que amenizan el journal; a Vanesa, por tus quejas y alegrías... espero seguir disfrutándolas unos cuantos años (¡¡vamos SF!!); a Ana, por esa energía desbordante, por las cañas por la tarde, por esa vuelta en moto que me vas a dar, por las tartas...ñam... A María, por esas risas junto al Evo; a Noelia, por las pelucas y tacones, y por aguantar mi música —tan distinta de las psicofonías—; a Rodrigo, por mantener tu calma... sigue practicando que ¡¡te quedas solo con todas ellas!! A Ana Blanco, recién llegada; a Irene, porque cuando no estás el labo es más oscuro, por tu candor (aunque ya haya veces que pienses mal), por la ilusión que desprendes, por las ovejitas y los transformers. A Marta, por tu sitio el primer día y por todo lo demás, por ser rancia como yo (bueno, un poco menos), por Moscú, por la mitad de doe, por... por todo, Compte. A Ángel. ¡Ay! Por la complicidad, por las franciskaners, por todos los marrones que te has comido por nosotros, por llevarme de la mano en el labo, y en el animalario y en el hospital, por enseñármelo todo... de la infantería francesa (el puesto de capitán de la guardia de alabarderos ya no guarda secretos para mí) y y y ¡porque te I love you!

A Peter Kristensen y a Erkki Ruoslahti, por permitirme aprender en sus laboratorios. A Tambet y Kazuki, por las perfusiones y por los caldos californianos. A Jules y Tobias, por hacerme sentir como en casa. A Lise, por compartir la nutella-time, y por Ben Harper.

A todos aquellos que han contribuido para que este trabajo saliese adelante, con revisiones, opiniones, comentarios, críticas demoledoras, etc.

A María, Mercedes, Inés, Tomás, Marta...porque una gran parte de mí es suya. Porque saben ya que esto de la tesis es, en realidad, un trabajo (y agotador).

A Rafa, el compañero de piso ideal, por las camas calientes, por las brochetas al micro, por las noches distendidas, por... A Paula, por todas esas actividades que todavía no hemos hecho. A Alexis, por entenderme, por los ratos de silencio que pueden ser tan expresivos. A Peri, por muchas cosas y, también, por los vicios. A Soraya, por tu paciencia, por tu elegancia (con suerte algo se me pega), por sacarme cuando voy a Salamanca. A Lore, por tu punto de locura.

A los desarrolladores de Skype, de todo corazón: gracias.

A Aida. Por la estadística, por las revisiones, por las rerevisiones, por las rerere... Por estar siempre ahí. Por ilusionarme, por cambiarme de planes cada dos por tres, por hacer que todo sea más interesante, por reírte con mis tonterías y por hacerme reír. Por hacer tiempo hasta que yo acabe. Porque sin ti no soy nada.

RESUMEN

GENERACIÓN Y APLICACIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES HUMANOS *IN VIVO*

La tecnología de presentación de péptidos y proteínas en la superficie de fagos filamentosos (*phage display*) es actualmente uno de los sistemas más utilizados para la obtención de anticuerpos, generalmente a partir de antígeno purificado o suspensiones homogéneas de células. En este trabajo, esta tecnología se ha adaptado para la generación de anticuerpos frente a antígenos en su contexto nativo en modelos animales *in vivo*. Como fuente de diversidad se han empleado repertorios humanos en formato de fragmento variable de cadena única o en formato monodominio.

Se han identificado y modificado algunos parámetros decisivos en la evolución de la selección, lo que ha permitido la obtención de anticuerpos recombinantes capaces de localizar específicamente depósitos tumorales en distintos formatos.

SUMMARY

GENERATION AND APPLICATION OF HUMAN RECOMBINANT ANTIBODIES *IN VIVO*

Phage display is often used as a source of recombinant antibodies against purified antigens or cell suspensions in modern biology. In this work, this technology has been modified in order to obtain antibodies against native antigens *in vivo*. The suitability of different formats for *in vivo* selection has been explored using both a single-chain Fv and a single domain library.

Key parameters in this process have been identified and adapted accordingly, allowing for the isolation of recombinant antibodies able of tumor targeting in different formats.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ÍNDICE	3
ABREVIATURAS Y SIGLAS	7
LISTADO DE FIGURAS	9
LISTADO DE TABLAS	II
I. INTRODUCCIÓN	13
I.1. Anticuerpos	13
I.2. Más allá del hibridoma: tecnología de selección de repertorios	18
I.3. Estrategias alternativas de selección	22
I.3.1. Modelos animales para realizar selecciones <i>in vivo</i> : un modelo de vasculatura humana y dos modelos tumorales	27
I.3.2. <i>In vivo</i> , sí, pero... Limitaciones del modelo	28
II. OBJETIVOS	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
III.1. Reactivos	35
III.2. Repertorios de anticuerpos	36
III.2.1. Griffin.I	36
III.2.2. DAb	37
III.3. Líneas celulares	38
III.4. Modelos animales	38
III.4.1. Modelo de vasculatura humana (MVH)	38
III.4.1.1. Bioluminiscencia	38
III.4.1.2. Perfusión y procesamiento del MVH	40
III.4.2. Modelos tumorales	40
III.4.2.1. Selección de repertorios sobre modelos tumorales	40
III.4.2.1.1. Generación de tumores	40
III.4.2.1.2. Rondas de selección	40
III.4.2.2. Evaluación de la capacidad de localización del anticuerpo anti-p32	41
2.15	41

III.5.	Proceso de selección	42
III.5.1.	Frente a proteína purificada	42
III.5.2.	Frente a mezclas complejas	43
III.5.2.1.	Modelo de vasculatura humana	43
III.5.2.1.1.	<i>Ex vivo</i>	43
III.5.2.1.2.	<i>In vivo</i>	44
III.5.2.2.	Modelo tumoral	44
III.5.2.2.1.	<i>In vitro</i>	44
III.5.2.2.2.	<i>Ex vivo</i>	45
III.5.2.2.3.	<i>In vivo</i>	45
III.5.2.2.3.1.	Ensayos de competición	46
III.5.2.2.3.2.	Ensayos de localización	47
III.5.2.2.4.	Identificación de la diana	47
III.5.3.	Evaluación de las selecciones	48
III.5.3.1.	Información de secuencias	48
III.6.	Obtención de los anticuerpos recombinantes	50
III.6.1.	Formato monomérico	50
III.6.2.	Trimerbody	51
III.7.	Inmunohistoquímica/IF	51
III.7.1.	Cuantificación	51
III.8.	Estadística	53
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
IV.1.	p32	57
IV.1.1.	Rondas de selección	57
IV.1.2.	Evaluación de los anticuerpos seleccionados y elección de candidatos	61
IV.1.3.	Evaluación de la capacidad de localización tumoral del anticuerpo anti-p32 2.15	66
IV.2.	Modelos animales	72
IV.2.1.	MVH	72
IV.2.1.1.	Determinación del período ventana para realizar la selección	72
IV.2.1.2.	Selección del repertorio de anticuerpos Griffin.1 sobre el MVH	72
IV.2.2.	Modelos tumorales	76
IV.2.2.1.	Selección con un repertorio de <i>scFv</i>	76
IV.2.2.1.1.	Ensayos de competición	78
IV.2.2.1.2.	Ensayos de localización	81

IV.2.2.2. Formato monodominio (DAb)	86
IV.2.2.2.1. Ensayos de competición	88
IV.2.2.2.2. Ensayos de localización	95
IV.2.2.2.3. DAb ₀₅ : distribución y cuantificación	98
IV.2.2.2.4. Identificación de la diana	108
IV.3. Reflexiones finales	116
V. CONCLUSIONES	123
VI. BIBLIOGRAFÍA	127
APÉNDICE	139

ABREVIATURAS Y SIGLAS

BGal	beta-galactosidasa
CD	cúmulo de diferenciación (del inglés <i>cluster of differentiation</i>)
DAb	anticuerpo recombinante en formato de monodominio VH (del inglés <i>domain antibody</i>)
Fab	fragmento de unión al antígeno (del inglés <i>antigen-binding site</i>)
Fc	fragmento cristizable
Fv	fragmento variable
Ig	inmunoglobulina
IMAC	cromatografía de afinidad por iones metálicos (del inglés <i>Immobilized metal ion affinity chromatography</i>)
LMIII	laminina III
NIP	hapteno 4-hidroxí-5-iodo-3-nitrofenol
scFv	fragmento variable de cadena única (del inglés <i>single-chain Fv</i>)
TPPF	tecnología de presentación de proteínas en la superficie de fagos filamentosos (del inglés <i>phage display</i>)

El inglés se ha erigido como idioma de comunicación en las ciencias experimentales. Muchos de los términos y expresiones han aparecido en las últimas décadas y no han sido aún incorporados al español. Para la hispanización de los términos en este trabajo, se han intentado seguir las recomendaciones y directrices de la Real Academia Española.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. La molécula terapéutica.	16
Figura 2. Esquema del proceso de selección empleando la tecnología de presentación de proteínas en la superficie de fagos filamentosos (TPPF).	19
Figura 3. Representación esquemática de algunos formatos generados mediante la tecnología de anticuerpos recombinantes.	20
Figura 4. Selección de péptidos empleando la TPPE.	23
Figura 5. Diferencias estructurales entre el bacteriófago T7 empleado en la selección <i>in vivo</i> de péptidos y el fago M13, empleado en la selección de anticuerpos recombinantes (modificado de[Krumpe y Mori 2006]).	24
Figura 6. Resumen del proceso de selección <i>ex vivo</i> a partir del MVH.	43
Figura 7. Plásmidos empleados para la obtención del <i>trimerbody</i> 2.15.	50
Figura 8. Procesamiento de las imágenes adquiridas.	52
Figura 9. Evolución de las selecciones.	58
Figura 10. Estudio de la especificidad de los anticuerpos seleccionados en formato de fago.	61
Figura 11. Evaluación de los anticuerpos seleccionados en formato soluble (inducción y reactividad).	61
Figura 12. Ensayos de competición entre el péptido LyP-1 y anticuerpos frente a p32.	62
Figura 13. Evaluación del formato soluble (inhibición y especificidad).	63
Figura 14. Estudio por citometría de flujo de la capacidad de reconocimiento de la proteína nativa en superficie de los anticuerpos seleccionados (<i>scFv</i>) frente a una línea de origen humano (A) o murino (B).	64
Figura 15. Purificación de los <i>scFv</i> .	67
Figura 17. Estudio funcional comparativo entre el anticuerpo 2.15 en formato monomérico y trimérico.	68
Figura 16. Localización <i>in vivo</i> de anticuerpos conjugados con Cy5.	68
Figura 18. Mejora en la localización tumoral al emplear el formato trimérico.	69
Figura 19. Estudios de colocalización en tumores.	70
Figura 20. Estudio comparativo de la fluorescencia acumulada en el tumor.	71
Figura 21. Determinación del período ventana para la realización de la selección.	73
Figura 23. Uso de los distintos segmentos.	75
Figura 22. Evolución de la relación entre clones completos y parciales en las distintas rondas de selección.	75
Figura 24. Enriquecimiento de la primera ronda de selección.	77
Figura 25. Evaluación de la composición del repertorio preseleccionado (4T1 y PPC1).	77
Figura 26. Estudio de la interacción de los repertorios enriquecidos con líneas celulares.	79
Figura 27. Evolución de las selecciones <i>in vivo</i> .	80
Figura 28. Ensayo de competición.	82

Figura 29. Ensayo de localización tumoral.	83
Figura 30. Comparación de las secuencias P6 y P29.	84
Figura 31. Digestión del espaciador o de regiones adyacentes.	85
Figura 32. Resumen de rondas de selección.	86
Figura 33. Evolución de las selecciones con el repertorio DAb.	87
Figura 34. Influencia del aumento de número de rondas de selección <i>in vivo</i> en la recuperación de partículas.	87
Figura 35. Ensayo de competición <i>in vivo</i> con los clones seleccionados.	89
Figura 36. Influencia del tiempo de circulación en el material recuperado.	90
Figura 37. Ensayo de competición con un tiempo de circulación de 24 h.	95
Figura 38. Comparación entre dos grupos de ratones que recibieron el mismo clon en dosis diferentes.	96
Figura 39. Ensayo de localización <i>in vivo</i> a las 24 h.	97
Figura 40. Comparación en la vascularización entre los distintos grupos.	99
Figura 41. Reconstrucción de la sección de un tumor 24 h después de la administración del fago.	100
Figura 42. Diferente acumulación de fago según su especificidad.	101
Figura 43. Comparación del patrón de tinción observado entre los órganos de ratones que recibieron el clon DAb05 y el clon control.	102
Figura 44. Tinción con marcadores de membrana y de citoesqueleto.	105
Figura 45. Tinción con algunos marcadores de células frecuentemente asociadas a tumores.	106
Figura 46. Resumen de la purificación de DAb.	109
Figura 47. Purificación de BGal usando una columna de sefarosa conjugada con el anticuerpo DAb anti-BGal.	110
Figura 48. Esquema de la purificación a partir del lisado tumoral.	112
Figura 49. Sesgo introducido por la capacidad de amplificación en el proceso de selección.	118
Figura 50. Esquema de la circulación a través de un capilar: retención inespecífica y fenestraciones.	119

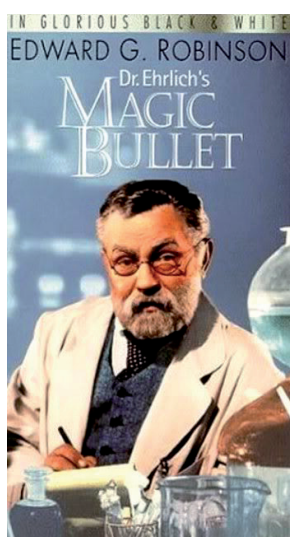
LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Listado de anticuerpos monoclonales aprobados para uso terapéutico (por la agencia europea del medicamento, EMA, o por su homóloga americana, FDA).	15
Tabla 2. Anticuerpos monoclonales empleados.	36
Tabla 3. Anticuerpos policlonales empleados.	37
Tabla 4. Líneas celulares utilizadas.	39
Tabla 5. Secuencia germinal y uso de CDR en los anticuerpos seleccionados.	59
Tabla 6. Enriquecimiento obtenido en las rondas de selección frente al MVH.	74
Tabla 7. Enriquecimiento de la primera ronda de selección en función de la cantidad inicial.	79
Tabla 8. Secuencias seleccionadas para los ensayos de competición (<i>scFv</i>).	80
Tabla 9. Resumen de las secuencias seleccionadas para los ensayos de competición.	89
Tabla 10. Secuencias seleccionadas para los ensayos de competición (DAb).	92
Tabla 11. Evolución de motivos CendR en las selecciones.	93
Tabla 12. Candidatos obtenidos de la trampa iónica.	110

I. INTRODUCCIÓN

“El objetivo es [...] encontrar sustancias químicas con una afinidad especial por los organismos patógenos que, como balas mágicas, vayan directas en pos de sus objetivos...”

P. Ehrlich



CARTEL DE LA PELÍCULA DE 1940 BASADA EN LAS BALAS MÁGICAS DE P. EHRLICH.

I.1. ANTICUERPOS

Aunque la primera «bala mágica» fue el compuesto 606 (salvarsán o arsfenamina), un compuesto cíclico derivado del arsénico capaz de curar la sífilis en pacientes, el término se ha aplicado tradicionalmente a «*las antitoxinas circulantes liberadas a la sangre cuando se produce un contacto entre determinados grupos de una toxina y las cadenas laterales de las células (moléculas receptoras específicas)*». Lo que hoy llamamos anticuerpos.

Originalmente, la fuente de anticuerpos era el antisero de animales inmunizados. Es decir, se obtenían preparaciones de anticuerpos policlonales de cantidad limitada y calidad variable. El proceso de obtención de estos anticuerpos es, en

principio, simple: administración del inmunógeno, comprobación de la respuesta a lo largo del tiempo y recolección del suero inmune. Sin embargo, la elección apropiada del organismo en el que producir estos anticuerpos es, a menudo, más complicada. La elección entre, por ejemplo, un ratón y una cabra para obtener un suero policlonal va a estar determinada por las instalaciones y la cantidad de material disponibles para realizar las inmunizaciones (microgramos para un ratón, miligramos para una cabra), la cantidad de suero necesario (1,5 – 2 ml de un ratón, litros de una cabra), etc. Además, el producto obtenido, aunque capaz de mediar la localización, fagocitosis o lisis mediada por complemento, es un producto heterogéneo de reducida utilidad *in vivo* (debido a la presencia de especificidades no deseadas, a la baja reproducibilidad obtenida entre lotes de distintas inmunizaciones, a la reactividad cruzada, etc.).

En 1975, Köhler y Milstein describen la posibilidad de obtener células inmortales capaces de secretar de manera continua «*anticuerpos de una especificidad predefinida*», lo que hoy conocemos como anticuerpos monoclonales [Kohler y Milstein 1975]. La fusión de una célula B del bazo de un animal inmunizado con una célula tumoral de mieloma genera unas células híbridas inmortales (hibridomas), que pueden crecer y producir el mismo anticuerpo de manera continua y, por tanto, solventar las carencias de disponibilidad y reproducibilidad atribuidas a los anticuerpos policlonales.

Sin embargo, a pesar del innegable éxito del campo de los anticuerpos monoclonales (Tabla 1), aún hoy, después de décadas de mejora, persisten muchas de las limitaciones originales de la tecnología del hibridoma: es lenta, tediosa y costosa (generalmente transcurren más de dos meses desde el momento de la primera inmunización hasta que se disponen de los clones necesarios para analizar su especificidad); es ineficiente (se obtienen típicamente entre 1 y 100 clones fusionados a células de mieloma por cada 10^7 linfocitos empleados al usar polietilenglicol para la fusión, relación que se multiplica por 100 al usar impulsos eléctricos); la producción de anticuerpos completamente humanos no ha sido históricamente satisfactoria (por dificultades técnicas y éticas en la inmunización, por la falta de células adecuadas para la fusión, y debido a que aún no se ha implantado industrialmente la producción de anticuerpos enteramente humanos en cepas de ratones transgénicos); el tipo de anticuerpo seleccionado no es, generalmente, preseleccionado, sino que se obtienen las distintas subclases de inmunoglobulinas de manera aleatoria; la generación de anticuerpos frente antígenos

TABLA 1. LISTADO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES APROBADOS PARA USO TERAPÉUTICO (POR LA AGENCIA EUROPEA DEL MEDICAMENTO, EMA, O POR SU HOMÓLOGA AMERICANA, FDA).

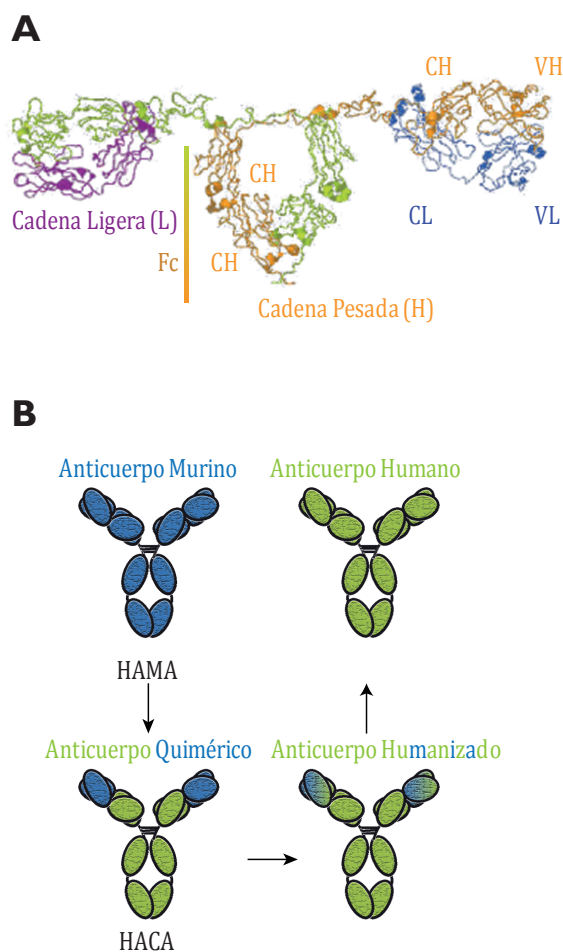
Diana	Nombre	Tipo	Año
a4 integrin	Natalizumab	Humanizado, IgG4	2004
BLyS	Belimumab	Humano, IgG1	2011
C5	Eculizumab	Humanizado, IgG2/4	2007
CD3	Muromonab-CD3	Ratón, IgG2a	1986
CD11a	Efalizumab	Humanizado, IgG1	2004
CD20	Rituximab	Quimérico, IgG1	1997
CD20	Tositumomab-I131	Ratón, IgG2a	2003
CD20	Ibritumomab	Ratón, IgG1	2002
CD20	Ofatumumab	Humano, IgG1	2009
CD33	Gemtuzumab	Humanizado, IgG4	2000
CD52	Alemtuzumab	Humanizado, IgG1	2001
CTLA-4	Ipilimumab	Humano, IgG1	2011
EGFR	Cetuximab	Quimérico, IgG1	2004
EGFR	Panitumumab	Humano, IgG2	2006
EPCAM/CD3	Catumaxomab	Rata/ratón, biespecífico	2009
GPIIb/IIIa	Abciximab	Quimérico, IgG1 Fab	1994
HER2	Trastuzumab	Humanizado, IgG1	1998
IgE	Omalizumab	Humanizado, IgG1	2003
IL1b	Canakinumab	Humano, IgG1	2009
IL2R	Basiliximab	Quimérico, IgG1	1998
IL2R	Daclizumab	Humanizado, IgG1	1997
IL6R	Tocilizumab	Humanizado, IgG1	2009
IL12/23	Ustekinumab	Humano, IgG1	2009
RANK-L	Denosumab	Humano, IgG2	2010
RSV	Palivizumab	Humanizado, IgG1	1998
TNF	Adalimumab	Humano, IgG1	2002
TNF	Infliximab	Quimérico, IgG1	1998
TNF	Certolizumab	Humanizado, Fab	2008
TNF	Golimumab	Humano, IgG1	2009
VEGF	Bevacizumab	Humanizado, IgG1	2004
VEGF	Ranibizumab	Humanizado, IgG1 Fab	2006

Anticuerpos aprobados frente a distintos tipos de cáncer. BLyS, estimulador de linfocitos B; C5, componente 5 del sistema de complemento; CD, cúmulo de diferenciación (*cluster of differentiation*); CTLA-4, antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; EPCAM, molécula de adhesión de la célula epitelial; GP, glicoproteína; IL, interleucina; RANK-L, ligando de receptor activador del factor nuclear κ B; RSV, virus sincitial respiratorio; TNF, factor de necrosis tumoral; VEGF, factor de crecimiento del endotelio vascular.

FIGURA 1. LA MOLÉCULA

TERAPÉUTICA.

A) Estructura esquemática de una inmunoglobulina, modificada de [Sun *et al.* 2005]. B) Evolución desde un anticuerpo murino: anticuerpo quimérico en el que las regiones V_H y V_L se ensamblan en un armazón de IgG humano y anticuerpo humanizado, en el que las regiones hipervariables que interaccionan con el antígeno (procedentes de un anticuerpo murino) se insertan en una estructura completamente humana.



autólogos es complicada, y muy difícil si existe un alto grado de conservación entre las secuencias humana y murina; además, hay antígenos que son tóxicos o que son poco inmunogénicos, frente a los cuales es complicado obtener anticuerpos [Sundaram y Yarmush 1999; Ponsel *et al.* 2011].

Una de las limitaciones iniciales está relacionada con la inmunogenicidad de los anticuerpos procedentes de otras especies al emplearlos con fines terapéuticos en humanos. La capacidad para desencadenar una respuesta inmune observada en los primeros anticuerpos monoclonales murinos (HAMA, del inglés *human anti-mouse antibodies*) se redujo sustancialmente empleando anticuerpos quiméricos (que, a su vez, indujeron respuestas HACA, del inglés *human anti-chimeric antibodies*) y anticuerpos humanizados (Figura 1). Hoy puede ser minimizada empleando anticuerpos completamente humanos o anticuerpos humanos recombinantes [Zhang *et al.* 2007], si bien es difícil erradicarla completamente (la propia variación alélica en los genes de las regiones constantes entre las diferentes poblaciones humanas hacen que una IgG terapéutica sea, de

hecho, una molécula que puede ser reconocida como no propia por algunos grupos de individuos; esta variación se complica al introducir las regiones variables y las características de la IgG empleada —agregación, solubilidad, ruta y dosis, etc).

La tecnología que ha facilitado la aparición de estos anticuerpos humanos recombinantes tiene su origen en el conocimiento de la estructura del anticuerpo, y en varios eventos sucedidos en la década de los ochenta:

Los anticuerpos son moléculas con dos funciones principales en el sistema inmune: reconocen y se unen al material exógeno o no propio; y promueven su eliminación. Por una parte se unen a estructuras presentes en la superficie del material exógeno (determinantes antigénicos) y, por otra, interactúan con otras moléculas efectoras (sistema de complemento, receptores en macrófagos y neutrófilos, etc.) para eliminarlo del organismo. Esta doble función no sólo es distinta conceptualmente, sino que está diferenciada espacialmente: una molécula de anticuerpo típica es un heterotetrámero constituido por cuatro cadenas iguales dos a dos. Se agrupan formando una estructura descrita tradicionalmente como «en forma de Y», de manera que dos cadenas pesadas —H, del inglés *heavy*; de un peso molecular entre 50000 y 77000 Da— se estabilizan por interacciones covalentes (puentes disulfuro) y no covalentes formando el tallo doble de la «Y» junto con las ramas sencillas. En cada una de estas ramas se acoplan las cadenas ligeras —L, del inglés *light*; de un peso molecular cercano a los 25000 Da— una en cada rama (Figura 1). El tallo (región Fc, fragmento cristalizable), junto con la parte inicial de las ramificaciones, es constante para los distintos anticuerpos y, precisamente, es la región Fc la implicada en la mayoría de las funciones efectoras. La interacción con el antígeno, en cambio, se halla en los extremos formados por las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, de modo que una inmunoglobulina tipo posee dos regiones de interacción con el antígeno (Fv, fragmento variable), y una región efectora. Fueron estas regiones variables las que se emplearon en las distintas tecnologías que, finalmente, proporcionaron los anticuerpos recombinantes humanos.

I.2.MÁS ALLÁ DEL HIBRIDOMA: TECNOLOGÍA DE SELECCIÓN DE REPERTORIOS

En la década de los ochenta se desarrolla la tecnología de clonación de repertorios como consecuencia de la identificación de regiones conservadas en los extremos de las secuencias nucleotídicas que codifican los dominios variables. Identificación que permite, en 1989 —tan sólo unos años después de la aparición de la reacción en cadena de la polimerasa— el clonaje de regiones Fv y Fab (fragmento de unión al antígeno, del inglés *antigen-binding site*) a partir de ADN genómico y de ARN mensajero de bazo [Orlandi *et ál.* 1989; Sastry *et ál.* 1989], lo que posibilita la obtención de repertorios de regiones de interacción con el antígeno de todas las células B presentes. Además, estas regiones de unión al antígeno se pueden expresar de manera funcional en bacterias, dirigiendo su expresión al citoplasma [Better *et ál.* 1988; Skerra y Pluckthun 1988].

En 1985, Smith demuestra la posibilidad de expresar proteínas exógenas fusionadas con la proteína III de fagos filamentosos y de utilizar esta expresión para purificar fagos con una determinada especificidad [Smith 1985]. Unos años más tarde, ambas tecnologías —el clonaje de repertorios y la expresión de proteínas exógenas— se unen para dar lugar a la tecnología de presentación de proteínas en la superficie de fagos filamentosos (TPPF, más conocida por la terminología anglosajona de *phage display*, Figura 2). Rápidamente se comprueba la capacidad de dicha tecnología para obtener anticuerpos recombinantes específicos frente a distintas moléculas: el hapteno feniloxazolona —a partir de repertorios inmunizados de ratón—; anticuerpos recombinantes humanos frente a la proteína gp120 del VIH; o frente al antígeno de superficie de la hepatitis B o el toxoide tetánico [Barbas *et ál.* 1991; Burton *et ál.* 1991; Clackson *et ál.* 1991; Zebedee *et ál.* 1992].

La TPPF permite un control muy superior respecto a la tecnología del hibridoma tanto de las condiciones de selección como de las condiciones de evaluación. Estas mejoras posibilitan la identificación de anticuerpos específicos frente a conformaciones antigénicas diferentes, o frente a regiones de interés predeterminadas al incluir durante la selección agentes competidores que dirigen el proceso frente a dominios distintos. Al usar repertorios naif (obtenidos a partir de distintos individuos, no inmunizados, de los que se obtienen colecciones de genes V_H y V_L que pueden ser distribuidos de manera aleatoria) o repertorios sintéticos (en los que los CDR son directamente sintetizados

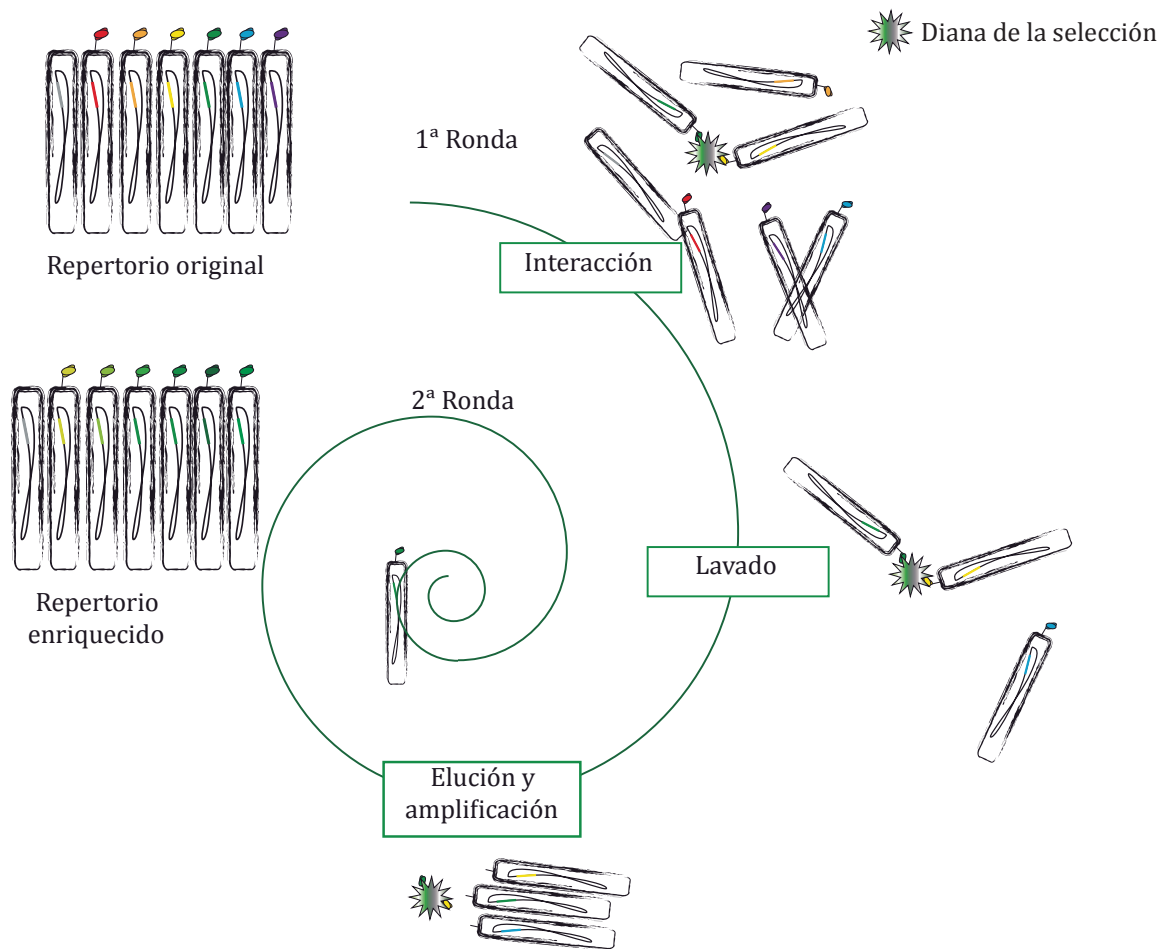


FIGURA 2. ESQUEMA DEL PROCESO DE SELECCIÓN EMPLEANDO LA TECNOLOGÍA DE PRESENTACIÓN DE PROTEÍNAS EN LA SUPERFICIE DE FAGOS FILAMENTOSOS (TPPF).

Un repertorio original (naif, inmune o sintético) es seleccionado en función de la afinidad por una determinada diana (ya sea una proteína purificada, una célula o un organismo) de manera que los fagos que permanecen unidos después de un proceso intensivo de lavado se eluyen y rescatan por infección para generar un repertorio enriquecido. El proceso se itera sucesivamente hasta obtener repertorios específicos. De este modo, se logra una reducción de la diversidad total del repertorio inicial, en favor del subconjunto de clones específicos para la diana escogida. La TPPF mantiene la identidad entre el genotipo y el fenotipo, dado que la molécula que se expresa en la superficie está codificada por material genético encapsidado en el interior del fago. Esta característica es común a otros sistemas de selección de repertorios, como la expresión en la superficie de levaduras (*yeast display*, [Boder y Wittrup 1997]), en la superficie de bacterias (*bacterial display*, [Francisco et ál. 1993]) o asociada a ribosomas (*ribosome display*, [Mattheakis et ál. 1994]), que se basan fundamentalmente en el mismo proceso que el descrito para la TPPF (*phage display*).

de novo de manera aleatoria) o semi-sintéticos (combinación de los dos anteriores) se pueden obtener anticuerpos dirigidos frente a regiones antigénicas muy conservadas evolutivamente que, de otro modo, serían inaccesibles o invisibles al sistema inmune empleando el procedimiento convencional de generación de anticuerpos monoclonales. Además, el proceso de maduración de la afinidad es una variación directa del mismo sistema de selección y permite la obtención de anticuerpos de una afinidad muy superior al límite teórico de 100 pM derivado de los mecanismos de activación de la

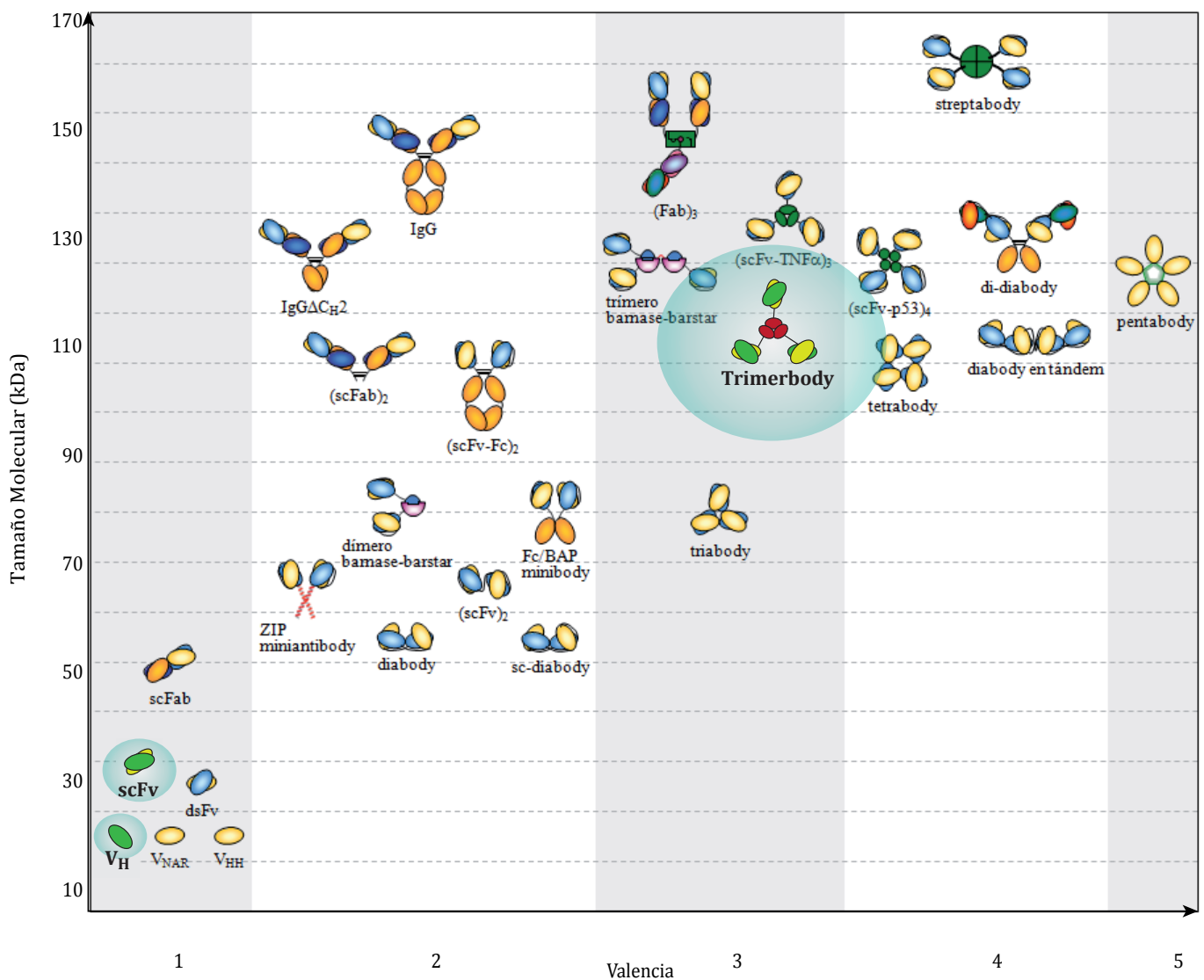


FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE ALGUNOS FORMATOS GENERADOS MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES.

Se resaltan los tres que se han empleado en este trabajo: monodominio (V_H o DAb, de *single domain antibody*); fragmento variable de cadena única (scFv, *single-chain Fv*) y Trimerbody. Figura modificada de [Cuesta *et al.* 2010].

célula B [Batista y Neuberger 1998; Foote y Eisen 2000] para los anticuerpos obtenidos por inmunización —se han descrito anticuerpos monovalentes de afinidad femtomolar [Boder *et ál.* 2000]—.

Una de las ventajas de la TPPF es la versatilidad de formato: tras un proceso de selección se obtienen anticuerpos recombinantes de muy reducidas dimensiones (un fragmento variable de cadena única o *scFv*, del inglés *single chain Fragment variable*, tiene un tamaño de 30 kDa frente a los 150 kDa de una IgG) que pueden combinarse entre sí para originar anticuerpos bivalentes, biespecíficos, triméricos, etc. Existe actualmente una plétora de formatos disponibles (Figura 3) con ventajas y desventajas en función del tamaño molecular, valencia, compañeros de la fusión o especificidad que permiten regular tanto la vida media como el grado de penetración del anticuerpo en el tejido diana [Cuesta *et ál.* 2010].

I.3. ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS DE SELECCIÓN

A pesar de los avances en los procesos de selección empleando repertorios de anticuerpos, se mantiene aún hoy una limitación derivada de la estrategia seguida. Muchos de los anticuerpos que son seleccionados *in vitro* —y que pueden, en cultivos celulares, bloquear un receptor, o la interacción con un ligando, o mediar una respuesta citotóxica o apoptótica— fracasan al ser trasladados a un contexto *in vivo*. Además, la identificación de dianas frente a las cuales generar anticuerpos es una tarea ardua y laboriosa.

En los últimos años se han publicado importantes avances en la identificación de potenciales dianas con utilidad terapéutica o diagnóstica en oncología. A partir de una aproximación genómica de SAGE (del inglés *serial analysis of gene expression*) que permite comparar el perfil de expresión de genes entre endotelio derivado de tumor y endotelio normal, se detectaron más de 40 genes expresados de manera diferente entre ambos tipos de endotelio que constituyen, por tanto, posibles dianas terapéuticas [St Croix *et al.* 2000]. De la membrana luminal de células endoteliales de muestras tumorales y de tejido sano se caracterizó —mediante geles 2D, análisis por espectrometría de masas y posterior validación con anticuerpos disponibles— un conjunto de marcadores expresados diferencialmente en endotelio de muestras tumorales de pulmón y en endotelio de pulmón sano. Además, algunos de los marcadores identificados han sido validados posteriormente *in vivo* [Oh *et al.* 2004]. Por último, la selección *in vivo* de repertorios peptídicos presentados en la superficie de fagos filamentosos ha permitido la identificación de determinados códigos moleculares (*vascular zip codes*) en forma de secuencias peptídicas cortas, específicas de diferentes tipos de células endoteliales [Pasqualini y Ruoslahti 1996]. En los trabajos de este último grupo, se administraron repertorios de péptidos a ratones portadores de tumores que fueron sacrificados al cabo de un tiempo variable. Tras la resección de los tumores, los bacteriófagos unidos a los vasos tumorales fueron recuperados, amplificados y sometidos a varias rondas de selección, hasta la identificación de péptidos específicos de los distintos tipos endoteliales (Figura 4). La incorporación de estos péptidos a diferentes agentes antitumorales se ha usado como estrategia de localización tumoral con el objetivo de mejorar el efecto

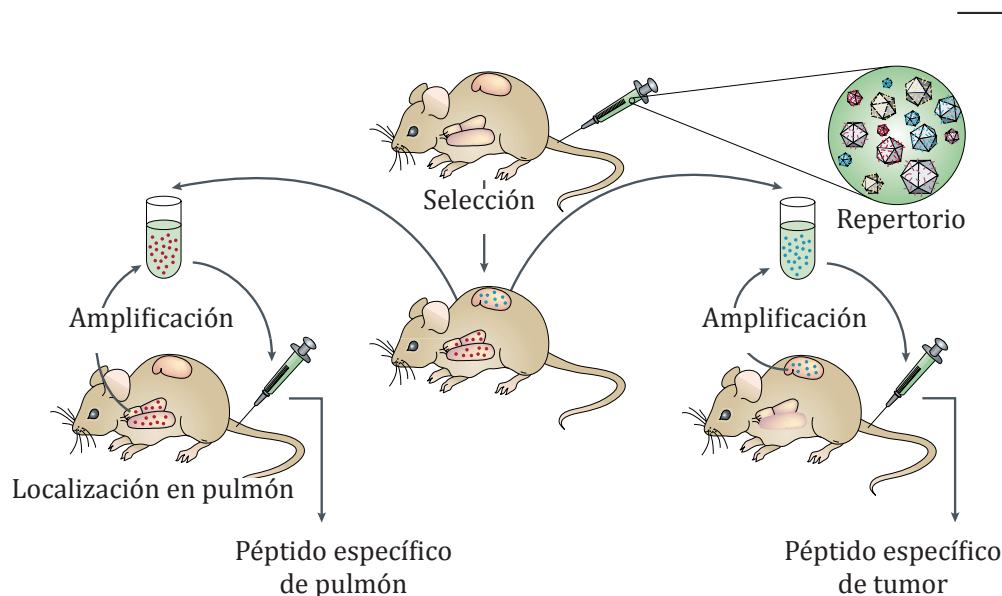


FIGURA 4. SELECCIÓN DE PÉPTIDOS EMPLEANDO LA TPPF.

Esquema del proceso de selección seguido para la obtención de péptidos específicos de distintos tipos de endotelio; modificado de [Pasqualini y Ruoslahti 1996]. Un repertorio inicial se inocula a un animal modelo. A partir del órgano diana (ya sea un pulmón sano o un tumor, como se representa en la figura, o cualquier otro modelo animal) se recuperan las partículas virales retenidas. Algunas de estas partículas habrán sido retenidas inespecíficamente y otras expresarán péptidos que interactúan de manera específica con las moléculas propias del contexto circundante. Una ventaja de esta estrategia es el uso del conjunto del organismo como un elemento de selección negativa, que propicia la depleción de secuencias que interactúan con antígenos comunes o abundantes, de secuencias que interactúan de manera inespecífica con la membrana (en función de la polaridad o hidrofobicidad), etc.

terapéutico de distintos agentes [Zhang *et al.* 2006; Lee *et al.* 2007; von Maltzahn *et al.* 2008; Karmali *et al.* 2009; Teesalu *et al.* 2009; Ruoslahti *et al.* 2010; Sugahara *et al.* 2010].

Son, precisamente, estos últimos estudios basados en la tecnología de presentación de péptidos en la superficie de fagos filamentosos los que motivan el trabajo actual. Hasta ahora, ha sido posible la identificación de secuencias cortas de aminoácidos (generalmente entre 7 y 9 residuos, cíclicos o lineales) con una elevada capacidad de discriminación entre los posibles tejidos diana. Sin embargo, este tipo de péptidos carecen, en general, de utilidad *per se*: incluso si son capaces de interactuar o bloquear algún receptor, su escasa vida media hace necesaria la conjugación a grandes partículas o estructuras biológicamente activas como liposomas o partículas paramagnéticas entre otros. Esta conjugación no sólo incrementa la vida media del compuesto, sino que lo dota de multivalencia.

No obstante, a pesar del interés que suscitan estos péptidos, las moléculas por excelencia en la mayoría de las terapias con compuestos biológicos son los anticuerpos. Por ello, en este trabajo se aborda la posibilidad de seleccionar anticuerpos recombinantes de una manera análoga a la empleada para seleccionar pequeñas secuencias peptídicas. Con este objetivo se pretende adaptar la tecnología (expresión multivalente, 400 copias por partícula viral; en el fago T7, que se asemeja a un esferoide de 60 - 100 nm de diámetro; la expresión se realiza en una parte de la cápside no implicada en la infección) al contexto del fago filamentoso (expresión monovalente, y sólo en un 1-10% de los fagos; en un fago filamentoso que se asemeja a un cilindro de 5 - 10 nm de diámetro por 900 nm de largo; la expresión se realiza asociada a la proteína III, directamente implicada en la infección; Figura 5).

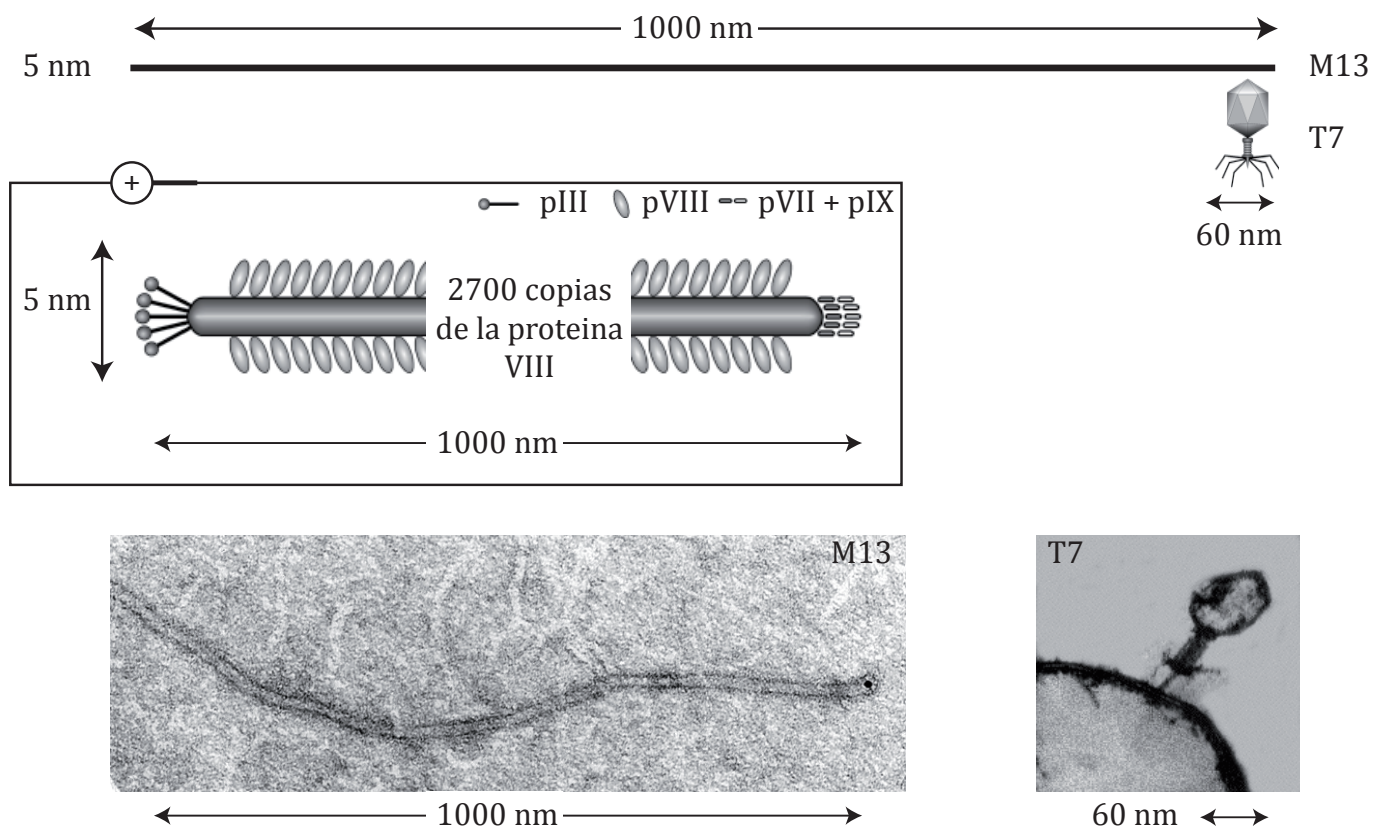


FIGURA 5. DIFERENCIAS ESTRUCTURALES ENTRE EL BACTERIÓFAGO T7 EMPLEADO EN LA SELECCIÓN *IN VIVO* DE PÉPTIDOS Y EL FAGO M13, EMPLEADO EN LA SELECCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES (MODIFICADO DE [KRUMPE Y MORI 2006]).

La selección siguiendo este procedimiento ofrece ventajas sobre otras estrategias, como la exposición de los fagos a las moléculas diana en el ambiente nativo. Los clones que interaccionan con moléculas ubicuas en la superficie celular o el plasma son deplecionadas de la población e, idealmente, sólo se recuperan aquellos anticuerpos que pueden acceder a las poblaciones diana y resisten las condiciones ambientales (proteasas, anticuerpos, células inmunes, etc.) que se encuentran en el sistema vascular y en el tejido diana.

Los anticuerpos dirigidos frente a antígenos asociados a tumor presentan inconvenientes debidos a la expresión heterogénea en la superficie celular o a los elevados niveles de antígeno circulantes que pueden neutralizar al agente terapéutico [Buchsbaum *et ál.* 2004]. Por otra parte, las dianas relacionadas con la angiogénesis —aunque por la localización de las células son antígenos expuestos a las moléculas circulantes— son relativamente poco abundantes en el contexto tumoral por el reducido número de células endoteliales localizadas en el tumor. Con estas limitaciones presentes surge la necesidad de identificar nuevos ligandos que sirvan como marcadores específicos y que no estén restringidos a un único tipo o compartimento celular. Los sistemas de selección de repertorio *in vivo* permiten la obtención de anticuerpos frente a estas dianas directamente (empleando un repertorio de anticuerpos en la selección) o indirectamente (identificando potenciales dianas mediante repertorios peptídicos y validándolas posteriormente con anticuerpos generados *in vitro*).

Un ejemplo de estas proteínas multicompartimentales es p32, una proteína identificada como receptor del péptido LyP-1 [Fogal *et ál.* 2008]. p32 se ha identificado de manera independiente en varias ocasiones como la proteína asociada al factor de splicing SF2 (SF2P32 [Krainer *et ál.* 1991]), proteína de unión a ácido hialurónico (HABP-1 [Gupta *et ál.* 1991]), receptor del dominio globular del factor C1q [Ghebrehiwet *et ál.* 1994] o proteína asociada a VIH-Tat (TAP, [Yu *et ál.* 1995]). Es, fundamentalmente, una proteína mitocondrial, aunque se ha localizado en diferentes compartimentos celulares (núcleo, membrana plasmática, retículo endoplásmico, etc. [Ghebrehiwet *et ál.* 1994; Dedio y Muller-Esterl 1996; Braun *et ál.* 2000; Kittlesen *et ál.* 2000; Mahdi *et ál.* 2001; Mahdi *et ál.* 2002]) y en distintos tipos celulares (lin-

focitos B, plaquetas, neutrófilos, eosinófilos, células endoteliales, macrófagos y células dendríticas o fibroblastos [Oiki y Okada 1988; Peerschke *et ál.* 1994; Eggleton *et ál.* 1995; Kuna *et ál.* 1996; Peerschke *et ál.* 1996; Steinberger *et ál.* 2002; Vegh *et ál.* 2003]).

No obstante, a pesar de la disparidad de localizaciones en las que se ha descrito la presencia de esta proteína, en los últimos años p32 se ha identificado repetidamente en la superficie de células tumorales en condiciones de hipoxia, en la membrana de macrófagos asociados a tumor así como en vasos linfáticos tumorales [Fogal *et ál.* 2008], y se han empleado con éxito estrategias dirigidas frente a ella basadas en el uso de nanopartículas, baculovirus, etc.[Laakkonen *et ál.* 2004; Makela *et ál.* 2006; Karmali *et ál.* 2009; Park *et ál.* 2010]. Por ello, se ha seleccionado esta molécula para realizar la aproximación indirecta antes mencionada: generación de anticuerpos recombinantes *in vitro* con potencial utilidad en terapia o en diagnóstico, a partir de una diana identificada mediante la selección *in vivo* de repertorios peptídicos.

I.3.1. MODELOS ANIMALES PARA REALIZAR SELECCIONES IN VIVO: UN MODELO DE VASCULATURA HUMANA Y DOS MODELOS TUMORALES

El proceso por el cual se generan nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos previos se denomina angiogénesis, y se considera un proceso fundamental tanto para el crecimiento tumoral por encima de un determinado volumen (a partir del cual los nutrientes y desechos no pueden difundir a un ritmo que permita el crecimiento del tumor) como para su diseminación al resto del organismo [Carmeliet 2005]. La inhibición de este proceso ha sido propuesta como una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer [Ferrara y Kerbel 2005], con un anticuerpo monoclonal aprobado inicialmente en cáncer de mama —Bevacizumab (Tabla 1), bajo el nombre comercial de Avastin— y actualmente usado (sólo o en terapia combinada) en carcinoma renal, glioblastoma y cáncer colorrectal.

El proceso angiogénico es muy complejo y consta de varias etapas que implican interacciones entre distintos tipos celulares, con la matriz extracelular, factores solubles, etc. y no puede ser completamente recapitulado *in vitro*, por lo que los modelos animales son esenciales para la búsqueda y validación de agentes terapéuticos [Sanz *et ál.* 2008]. En nuestro laboratorio se ha desarrollado un modelo humanizado de angiogénesis en ratones inmunodeficientes, en el que tanto las células endoteliales como las células murales de soporte son de origen humano (MVH, de Modelo de Vascularidad Humana). En el modelo se generan estructuras vasculares que son capaces de interconectarse con la red vascular del ratón y mantener su funcionalidad durante más de 120 días [Sanz *et ál.* 2008].

En el presente trabajo, este modelo se presenta como una posible diana para la selección de anticuerpos frente a marcadores expresados específicamente durante el proceso angiogénico —partiendo de la premisa de que alguno de los marcadores expresados durante el proceso de remodelación vascular puede ser distinto a las proteínas de superficie expresadas cuando el endotelio se haya anastomosado con los vasos sanguíneos del ratón y se encuentre en estado quiescente—. Por ello, uno de los objetivos preliminares es la identificación de la ventana temporal durante la cual realizar la selección.

El objetivo, en todo caso, es la obtención de anticuerpos con utilidad en terapia o diagnóstico, por lo que se ha abordado otra estrategia de selección, basada en el desarrollo de tumores en modelos animales. Como modelos representativos se han usado dos modelos ampliamente difundidos en la literatura científica: un modelo singénico altamente metastático de cáncer de mama (desarrollado por la línea 4T1 [Aslakson y Miller 1992], procedente de un tumor espontáneo en ratones Balb/c) y un modelo de cáncer de próstata humano desarrollado por la línea tumoral PPC-1 [Brothman *et ál.* 1991] en ratones inmunodeficientes.

1.3.2. *IN VIVO*, SÍ, PERO... LIMITACIONES DEL MODELO

Uno de los objetivos de este trabajo se centra en la obtención de anticuerpos recombinantes humanos con un potencial interés terapéutico o diagnóstico. Para ello, es preciso que los anticuerpos obtenidos durante el proceso de selección sean plenamente compatibles con el posterior uso *in vivo*. Es decir, la finalidad no es meramente identificar anticuerpos frente a algún antígeno asociado a tumor o asociado a endotelio activado, sino obtener anticuerpos que sean capaces de localizarse en un tumor *in vivo*. Realizar la selección *in vivo* puede permitir alcanzar los objetivos indicados.

Las alternativas evaluadas en el proceso de selección se deben a una consideración previa: la diversidad inicial de la mayoría de repertorios naif disponibles se sitúa en valores próximos a 10^9 . Es decir, hay, potencialmente, 10^9 clones posibles en todo el repertorio [Griffiths *et ál.* 1994; de Wildt *et ál.* 2000; Gennari *et ál.* 2004; Christ *et ál.* 2006]. Esto asegura que, al menos hipotéticamente, sea posible encontrar anticuerpos específicos con una afinidad en el rango nanomolar frente a prácticamente cualquier antígeno [Griffiths *et ál.* 1994; Tanaka *et ál.* 2009]. Sin embargo, una de las limitaciones del formato en el que se construyen, mantienen y emplean estos repertorios es la limitada expresión de la proteína recombinante en la superficie del fago. En el formato fagémido —el estándar en los repertorios de anticuerpos recombinantes— el repertorio se mantiene como un plásmido que, típicamente, confiere resistencia a un marcador de selección (como ampicilina en el caso del repertorio Griffin.1). El plásmido consta del origen de replicación, las secuencias de empaquetamiento, el gen de resistencia al antibiótico y una construcción de una proteína de fusión entre la proteína III del fago y el anticuerpo recombinante —generalmente bajo el control de un promotor reprimible—. Este plásmido no porta el conjunto de genes necesarios para el

ensamblaje, empaquetamiento y liberación de las partículas infectivas del fago, sino que dicho material ha de ser suministrado por un fago auxiliar. Esto hace que, tras la infección o superinfección con el mismo, la mayor parte de la proteína III sintetizada tenga su origen en el material genético del fago auxiliar y no en el plásmido que codifica para la proteína de fusión con el anticuerpo recombinante. El resultado, en el sobrenadante, es que entre 1 y 10 de cada 100 partículas virales incorpora una de las proteínas de fusión del repertorio [Clackson y Wells 1994]. Es decir, aproximadamente el 90 - 99% de los fagos obtenidos, incluso si en su interior han ensamblado el fagémido, no contienen un anticuerpo recombinante en la superficie.

Al diseñar la estrategia de selección se consideran ambas cuestiones: por un lado, la diversidad original del repertorio es de 10^9 ; por otro, sólo entre el 1% y el 10% de los fagos tienen uno de todos los posibles anticuerpos recombinantes. Esto implica que, para tener representado todo el repertorio, es necesario un mínimo teórico de 10^{11} partículas virales. En condiciones ideales, partiendo del repertorio recién generado en bacterias, se estima que son necesarias, al menos, 10 copias de cada para asegurar que la diversidad no disminuye [Figini *et ál.* 2003], lo que supone un total de 10^{12} fagos. Este número total de fagos es asumible al realizar selecciones *in vitro* con una proteína purificada, contexto en el que se pueden emplear fácilmente 10^{13} partículas virales (para tener, aproximadamente, 100 copias de los posibles clones). Sin embargo, en contextos más complejos (como una selección *in vivo*, en la que no sólo hay una selección negativa —frente a la mayor parte del endotelio accesible— sino también una depleción inespecífica de todo el repertorio inoculado —principalmente en bazo e hígado—), el número mínimo de repeticiones para asegurar la posibilidad de que todos los clones se encuentren en el entorno de la diana se multiplica exponencialmente.

Además, en un contexto *in vivo*, no es posible incrementar indefinidamente el repertorio inicial por limitaciones inherentes al modelo: por una parte, tan sólo hay, aproximadamente, 2 ml de volumen de distribución disponibles en un animal de 25 g de peso. Por otra, este volumen está confinado en el interior del árbol vascular que puede actuar *per se* como un filtro inespecífico si se administra una cantidad suficiente de partículas. Esto hace que, en general, no se empleen más de 10^{11} - 10^{12} partículas totales por animal de experimentación [Laakkonen *et ál.* 2002; Hamzeh-Mivehroud *et ál.* 2008;

Veleva *et ál.* 2011]. Es decir, para analizar un repertorio en formato fagémido de una diversidad en torno a 10^9 , sería necesario emplear entre 100 y 1000 ratones para una primera ronda de selección.

Como alternativas para mantener la diversidad del subconjunto de clones específicos y minimizar el número de animales de experimentación necesarios se puede optar por el enriquecimiento del repertorio *in vitro* —frente a células (o mezclas definidas) procedentes de cultivo—, *ex vivo* —frente a mezclas complejas de células o de células y matriz procedentes de un modelo animal— o combinaciones de ambas estrategias.

Ambas aproximaciones tienen ventajas y desventajas. El enriquecimiento *in vitro* se realiza frente a una población relativamente homogénea y en condiciones perfectamente definidas y reproducibles. De esta manera (combinando rondas de selección positivas y negativas) se pueden seleccionar anticuerpos frente a antígenos expresados por una línea celular determinada. Sin embargo, estos antígenos serán, en general, específicos de la línea celular y no estarán, por tanto, necesariamente accesibles desde el torrente circulatorio.

El enriquecimiento *ex vivo*, en cambio, añade complejidad al sistema de selección, pero permite la obtención de anticuerpos frente a antígenos de cualquier compartimento tumoral, incluyendo antígenos específicos del endotelio, antígenos compartidos por el endotelio y las células tumorales, antígenos de la matriz extracelular, antígenos de células estromales o infiltrantes y antígenos específicos de las células tumorales.

Cualesquiera que sean los procedimientos de enriquecimiento, el objetivo es mantener la capacidad de obtener anticuerpos funcionales en el contexto *in vivo*, pero limitando el número total de clones que analizar.



II. OBJETIVOS

1. Generar anticuerpos recombinantes humanos frente a la proteína p32 y evaluar su uso en modelos animales.
2. Adaptar las estrategias de selección actualmente disponibles a contextos de selección *in vivo*:
 - a. En un modelo de vasculatura humana.
 - b. En modelos tumorales.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

“Aún no dispongo de datos.

Es un error capital teorizar antes de tener datos. Sin darse cuenta, uno empieza a deformar los hechos para que se ajusten a las teorías, en lugar de ajustar las teorías a los hechos.”

S. Holmes

III.1. REACTIVOS

La proteína recombinante humana p32 empleada procede de una purificación por cromatografía de afinidad sobre iones metálicos inmovilizados (IMAC) del material obtenido de bacterias. La proteína recombinante murina p32 procede de United States Biological. La tripsina, colagenasa IA, BSA, *o*-fenilenediamina dihidroclorido (OPD), isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido son de Sigma-Aldrich. La albúmina bovina se conjuga con 4-hidroxi-5-iodo-3-nitrofenol (NIP) en un ratio molar NIP:BSA de 10:1 siguiendo un protocolo ya descrito [Reth *et al.* 1979]. La dispasa II y la DNasa I son de Roche. La laminina LM111, obtenida del sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm, procede de BD Biosciences. Los anticuerpos empleados se resumen en las siguientes tablas (Tabla 2 y Tabla 3).

TABLA 2. ANTICUERPOS MONOCLONALES EMPLEADOS.

Clon	C.	E.A.	E. S.	Origen	Proveedor	Catálogo
M1/70		CD11b	H/R	Rata	Abcam	ab8878
MEC13.3		CD31	R	Rata	BD Biosciences	553370
MOPC-21	FITC	Control de Isotipo		Ratón	Abcam	ab18431
MOPC-21	FITC	Control de Isotipo		Ratón	Abcam	ab18443
N/A	HRP	M13		Ratón	GEHealthcare	27-9421-01
W6/32		HLA-I	H	Ratón	eBiosciences	14-9983
60.11		p32	H/R	Ratón	Abcam	ab24733
74.5.2		p32	H/R	Ratón	Abcam	ab24734
9.E10		c-myc	H/R	Ratón	Purificado a partir del hibridoma	
9.E10	FITC	c-myc	H/R	Ratón	Abcam	ab64478
9.E10	HRP	c-myc	H/R	Ratón	Abcam	ab62928
N/A	HRP	c-myc	H/R	Ratón	Invitrogen	R951-25

C. conjugación; E.A. especificidad antigénica; E.S. especificidad de especies; H, humano; R, ratón; N/A, información no proporcionada por la casa comercial.

III.2. REPERTORIOS DE ANTICUERPOS

III.2.1. GRIFFIN.1

El repertorio Griffin.1 (obtenido del laboratorio de Biología Molecular del Medical Research Council, Cambridge, UK) es un repertorio humano en formato *scFv*, construido a partir de segmentos sintéticos de regiones variables (V), con una diversidad estimada de $1,2 \times 10^9$ clones obtenida tras la reclonación de las regiones V de las cadenas ligera (V_L) y pesada (V_H) de los vectores del repertorio *lox* [Griffiths *et al.* 1994] en el vector fagémido pHEN-2 [Hoogenboom *et al.* 1991]. El repertorio de *scFv* fusionados a la proteína III de la cápside viral (*scFv*-pIII), que contienen secuencias aleatorizadas en cada una de las regiones determinantes de complementariedad 3 (CDR₃, del inglés *complementarity-determining region 3*), se mantiene en la cepa supresora TG1 de *E. coli* (TG1: K12, $\Delta(lac-pro)$, *supE*, *thi*, *hsdD5/F' traD36*, *proA*⁺*B*⁺, *lacI*^q, *lacZ* Δ M15), hasta la superinfección con el fago auxiliar. Como fago auxiliar que proporcione los genes

TABLA 3. ANTICUERPOS POLICLONALES EMPLEADOS.

Conjugación	E.A.	Origen	Proveedor	Catálogo
HRP	Ig Conejo	Burro	GEHealthcare	NA934
A488	Ig Conejo	Cabra	Invitrogen	A11008
A546	Ig Conejo	Cabra	Invitrogen	A11010
A546	Ig Rata	Cabra	Invitrogen	A11081
A488	Ig Ratón	Cabra	Invitrogen	A11029
A546	Ig Ratón	Cabra	Invitrogen	A11030
PE	Ig Ratón	Cabra	Jackson ImmunoResearch	115-116-071
	Bacteriófago-fd	Conejo	Sigma	B7786
	F-Luciferasa	Conejo	MBL	PMo16
	LYVE	Conejo	Abcam	ab14917
	p32 humana	Conejo	Lab. Ruoslahti [Fogal et ál. 2008]	
	p32 murina	Conejo	Lab. Ruoslahti [Fogal et ál. 2008]	
FITC	Ig Ratón	Oveja	Boehringer	821462
HRP	Ig Ratón	Oveja	GEHealthcare	NA931

E.A. especificidad antigénica.

necesarios para la formación de partículas virales que expongan el fragmento variable en su superficie se emplea el fago KM13, sensible a la actividad hidrolítica de la tripsina [Kristensen y Winter 1998].

III.2.2. DAB

El repertorio de anticuerpos humanos en formato monodominio (*Human Domain Antibody Library*; repertorio DAB) se obtuvo de Source BioScience LifeSciences. El repertorio está construido en formato de fagémido y está basado en el marco $V_{H(V3-23/D47)}$ en el que se introdujo diversidad (estimada en 3×10^9) en los dominios clásicos de unión al antígeno (CDR1, CDR2 y CDR3) por mutagénesis inducida por PCR [Christ et ál. 2006]. Este repertorio presenta algunas características que lo distinguen de los clásicos repertorios de *scFv*. Por un lado, la presencia de un único dominio (V_H) hace innecesario un espaciador entre los dominios V_H y V_L . Además, la mayoría de los anticuerpos obtenidos en este repertorio comparten una alta resistencia a la desnaturalización térmica, así como a la agregación, y una moderada resistencia a condiciones ácidas [Christ et ál.

2007; Famm *et ál.* 2008; Dudgeon *et ál.* 2009]. Adicionalmente, prácticamente todos los anticuerpos solubles de este repertorio mantienen la afinidad por la proteína A del V_H original, lo que facilita su purificación y los estudios de interacción con otras proteínas.

III.3. LÍNEAS CELULARES

En la Tabla 4 se resumen las células eucariotas empleadas en este trabajo. El cultivo de las mismas se realiza a 37 °C, 95% de humedad y 5% de CO₂, salvo cuando se especifique lo contrario. Todos los medios proceden de LONZA.

III.4. MODELOS ANIMALES

Los protocolos utilizados para la manipulación de animales, que a continuación se detallan, han sido aprobados por el Comité de Ética Animal del Hospital Universitario Puerta de Hierro.

III.4.1. MODELO DE VASCULATURA HUMANA (MVH)

Para el establecimiento de un modelo *in vivo* de vasculatura humana (MVH) se han empleado ratones inmunodeficientes (Hsd: *athymic Nude/Nude*; Harlan Iberica) de cinco semanas de edad. Bajo anestesia inhalatoria (isoflurano 1-2% vaporizado en oxígeno, 0,5-1,0 l/min), se realiza un implante en la pared abdominal de una mezcla 4:1 de células HUVEC^{LucEGFP} (3×10^5) con MSC ($7,5 \times 10^4$) en 200 µl de Matrigel 8 mg/ml (BD Biosciences) suplementado con heparina (128 U/ml Sigma-Aldrich), factor de crecimiento endotelial vascular humano (50 ng/ml, VEGF) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (150 ng/ml, bFGF; PeproTech).

III.4.1.1. BIOLUMINISCENCIA

El seguimiento del establecimiento del implante —así como la determinación del período idóneo para llevar a cabo la selección del repertorio de anticuerpos— se realiza evaluando la emisión de luminiscencia *in vivo*. Para ello, se administra por vía intraperitoneal una solución salina con ketamina (97,5 µg/g de peso; Ketolar®, Pfizer), y diazepam (7,5 µg/g de peso; Valium®, Roche) con el objetivo de anestesiarse al animal. Posteriormente se inyecta una solución de sal potásica de D-luciferina (Promega) disuelta en PBS (125 mg/kg de peso) a una concentración de 17,5 mg/ml (175 µl por animal de 24,5 g de peso) y se introduce al animal en el equipo de recogida de imágenes

TABLA 4. LINEAS CELULARES UTILIZADAS.

Línea celular	Origen	Tipo celular	Sp.	Medio
HEK-293	CRL-1573	Epitelio de riñón embrionario	H	DMEM-C
HUVEC	M. Feijóo	Células endoteliales aisladas de cordón umbilical	H	EGM2-C
HUVEC ^{LucEGFP}	Laboratorio [Sanz <i>et ál.</i> 2008]	HUVEC transfectadas con un vector lenti-viral para expresar Luciferasa y la proteína verde fluorescente (EGFP)	H	EGM2-C
MDA-MB-231	HTB-26	Adenocarcinoma de mama	H	DMEM-C
MSC	J.L. Vicario	Células madre mesenquimales de médula ósea	H	MEMa-C
PPC-1	CRL-1435	(PC-3) adenocarcinoma de próstata de grado IV	H	DMEM-C
U-937	CRL-1593.2	Linfoma histiocítico	H	RPMI-C
4T1	CRL-2539	Adenocarcinoma de mama	R	RPMI-C

Si no se especifica lo contrario, el proveedor es la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Sp. Especie; H, humano; R, ratón. DMEM-C: Medio DMEM suplementado con un 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (FCS) y con una mezcla de 2 mM L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina; RPMI-C Medio RPMI suplementado con un 10% (vol/vol) de FCS, y con una mezcla de 2 mM L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina;; EGM2-C: Medio EGM-2 suplementado con 2% (vol/vol) de FCS y con factores de crecimiento endotelial comerciales (Cambrex, Baltimore, MD, USA); MEMa-C: MEM alpha suplementado con Glutamax (Invitrogen) y con un 10% (vol/vol) de FCS.

que incorpora una cámara ORCA-2BT dotada de un dispositivo de carga acoplada y un sistema de refrigeración para trabajar a una temperatura de -80 °C, bajo control del programa Wasabi (todo ello de Hamamatsu Photonics). La adquisición de imágenes se realiza secuencialmente en exposiciones de 60 s hasta asegurar la recogida del pico máximo de emisión de luz. Para cuantificar la emisión de luz se delimitan las regiones de interés correspondientes al implante así como a regiones de control y se transforman los valores obtenidos en fotones por segundo —previa substracción del fondo (el fondo se calcula como un valor promedio constante para toda la imagen a partir de una región de interés definida en un área sin animal, en la imagen corregida con una imagen fija obtenida en las mismas condiciones sin animal)—. La representación gráfica se realiza empleando una escala de colores y superponiendo la imagen de bioluminiscencia (BLI) con una imagen de campo claro.

III.4.1.2. PERFUSIÓN Y PROCESAMIENTO DEL MVH

Se emplea como diana el MVH en proceso de angiogénesis. El procesamiento previo, necesario para obtener una suspensión celular frente a la que hacer la selección, consta de una perfusión intracardiaca con 50 ml de una solución de DMEM suplementada con un 4% de BSA (estéril —filtrada por 0,22 μm — y atemperada a 40 °C) seguidos por 50 ml adicionales de PBS (también atemperado) y de la resección del MVH seguida de una fase de disgregación mecánica y 40 minutos de digestión enzimática —empleando un bisturí y una solución de collagenasa IA (0,5 mg/ml), DNasa I (0,01 mg/ml) y dispasa II (1 mg/ml) en PBS, lavados con PBS y tratamiento con una solución para lisar los hematíes remanentes (ACK)—. La suspensión celular obtenida se enfrenta al repertorio tal y como se describe en el apartado III.5.2.1.

III.4.2. MODELOS TUMORALES

III.4.2.1. SELECCIÓN DE REPERTORIOS SOBRE MODELOS TUMORALES

III.4.2.1.1. Generación de tumores

Para el establecimiento de un modelo de selección sobre tumores se han empleado ratones inmunodeficientes (Hsd: *athymic Nude/Nude*) de cinco semanas de edad o ratones inmunocompetentes Balb/c. Bajo anestesia inhalatoria, se realiza un implante ortotópico de 2×10^6 células 4T1 en 200 μl de PBS en ratones Balb/c —modelo ortotópico de cáncer de mama— o se inoculan de manera subcutánea 2×10^6 células PPC-1 en 200 μl de PBS en el flanco de ratones inmunodeficientes —modelo subcutáneo de cáncer de próstata—.

III.4.2.1.2. Rondas de selección

Los procedimientos de selección *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo*, se describen en el apartado III.5.2.2.

III.4.2.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOCALIZACIÓN DEL ANTICUERPO ANTI-P32 2.15

Para evaluar la capacidad de localización del anticuerpo anti-p32 2.15, se realiza una implantación ortotópica de células tumorales MDA-MB-231 (2×10^6) en ratones inmunodeficientes de 6 semanas de edad, mantenidos con una dieta baja en manganeso (ssniff Spezialdiäten GmbH). Cuando el volumen tumoral (calculado como $d^2 \times D \times 0,52$; d, diámetro menor, D, diámetro mayor) alcanza un valor entre 0,2 y 0,4 cm³, se inoculan por la vena caudal 100 µl de una solución de anticuerpo conjugado con cianina-5 disuelto en PBS. Se introduce al animal anestesiado a distintos tiempos en el equipo de recogida de imágenes para obtener una serie temporal de la evolución de la localización del anticuerpo. En cada punto se adquieren tres imágenes de 16 bits (valores entre 0 y 65535): una de campo claro —que servirá para superponer las imágenes de fluorescencia sobre la silueta del ratón—; una imagen de fluorescencia específica de Cy5 —obtenida con el filtro de excitación centrado a 632,8 nm y el filtro de emisión con un paso de banda entre 665 y 680 nm—; y una tercera imagen de valor de referencia de autofluorescencia —con el filtro de excitación centrado a 470 nm y el mismo filtro de emisión que la imagen específica—. A continuación, se elimina el fondo de cada una de las imágenes y se sustrae, de la imagen específica de Cy5, la imagen normalizada de autofluorescencia para desenmascarar así la señal procedente de la Cy5 conjugada al anticuerpo de la autofluorescencia del ratón. Esta imagen se colorea en función de la intensidad —obteniéndose una figura en formato RGB— empleando el software Hokawo (actualización del software Wasabi, de Hamamatsu) y se superpone sobre la imagen de campo claro (coloreada en el espectro de 448 nm para una mejor visualización).

La cuantificación se realiza sobre la imagen de 16 bits previa a la superposición. Para ello, se identifica el área de interés correspondiente al tumor y se obtiene un valor de intensidad promedio, que se emplea para comparar entre los distintos anticuerpos.

En los tiempos definidos como final del experimento —coincidentes con la máxima intensidad observada en el tumor—, se procede a la eutanasia del ratón —inmediatamente después de la adquisición de las imágenes correspondientes—. A continuación, se extrae el tumor junto con los órganos de referencia (riñón, hígado, bazo, corazón y pulmones) y se realiza una adquisición de imágenes de los

órganos *ex vivo*, siguiendo el procedimiento ya detallado. Los órganos se colocan inmediatamente en el medio de inclusión OCT® (Sakura Tissue Tek) y se sumerge el bloque en isopentano enfriado con nitrógeno líquido para conservar las muestras hasta la realización del análisis correspondiente por inmunohistoquímica.

III.5. PROCESO DE SELECCIÓN

III.5.1. FRENTE A PROTEÍNA PURIFICADA

Para la selección del repertorio Griffin.¹ frente a la proteína recombinante p32 se procede siguiendo un protocolo común en el que se realiza una adsorción de la proteína diana en inmuntubos (Maxisorp, Nunc) a 4 °C (4 ml a una concentración de 10 µg/ml) durante 16 h. Se lava dos veces con PBS y se bloquea durante 2 h a 37 °C con una solución del 4% de BSA en PBS. En ese tiempo, 10^{13} partículas infectivas de fago del repertorio original se bloquean en 1 ml de la misma solución. Transcurridas 2 h de bloqueo, se añaden los fagos prebloqueados al inmuntubo y se incuba durante 30 minutos en agitación y 90 minutos adicionales en reposo, a temperatura ambiente. En la primera ronda de selección se realizan 10 lavados con PBS 0,05% Tween-20 y 10 lavados con PBS (para las rondas de selección posteriores, se incrementa el número de lavados a 20 cada vez). Los fagos que permanecen unidos a la superficie del inmuntubo se eluyen empleando una solución enzimática (tripsina 1 mg/ml en 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM CaCl₂) a temperatura ambiente durante 20 minutos en agitación continua. Los fagos eluidos se emplean para infectar *Escherichia coli* TG1 (K12, $\Delta(lac-pro)$, *supE*, *thi*, *hsdD5/FtraD36*, *proA⁺B⁺*, *lacI^q*, *lacZ* Δ M15 [Gibson 1984]) que se siembran en placas de LB agar suplementadas con 100 µg/ml de ampicilina y 1% glucosa. El repertorio enriquecido se rescata tras la superinfección con el fago auxiliar KM13 durante 1 h a 37 °C, y la producción continúa durante 16-20 h a 30 °C en medio 2xYT suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina. Las partículas virales se purifican por precipitación estándar con 20% polietilenglicol (PEG-6000) 2,5 M NaCl. Se resuspenden en PBS suplementado con glicerol al 15% y se almacenan a -80 °C hasta su uso.

III.5.2. FRENTE A MEZCLAS COMPLEJAS

III.5.2.1. MODELO DE VASCULATURA HUMANA

Una vez determinado el período idóneo para realizar la selección del repertorio de anticuerpos en el MVH, ésta se lleva a cabo en dos etapas: *ex vivo* e *in vivo*.

III.5.2.1.1. *Ex vivo*

Tras procesar el implante MVH, el componente celular se resuspende en un volumen de 330 µl en PBS suplementado con 4% BSA y se mantiene en agitación durante 30 min. A este volumen se añade el repertorio —que ha sido previamente bloqueado en PBS con un 4% de BSA y que ha sido deplecionado empleando como diana un implante análogo al descrito para el MVH, pero carente del componente endotelial—

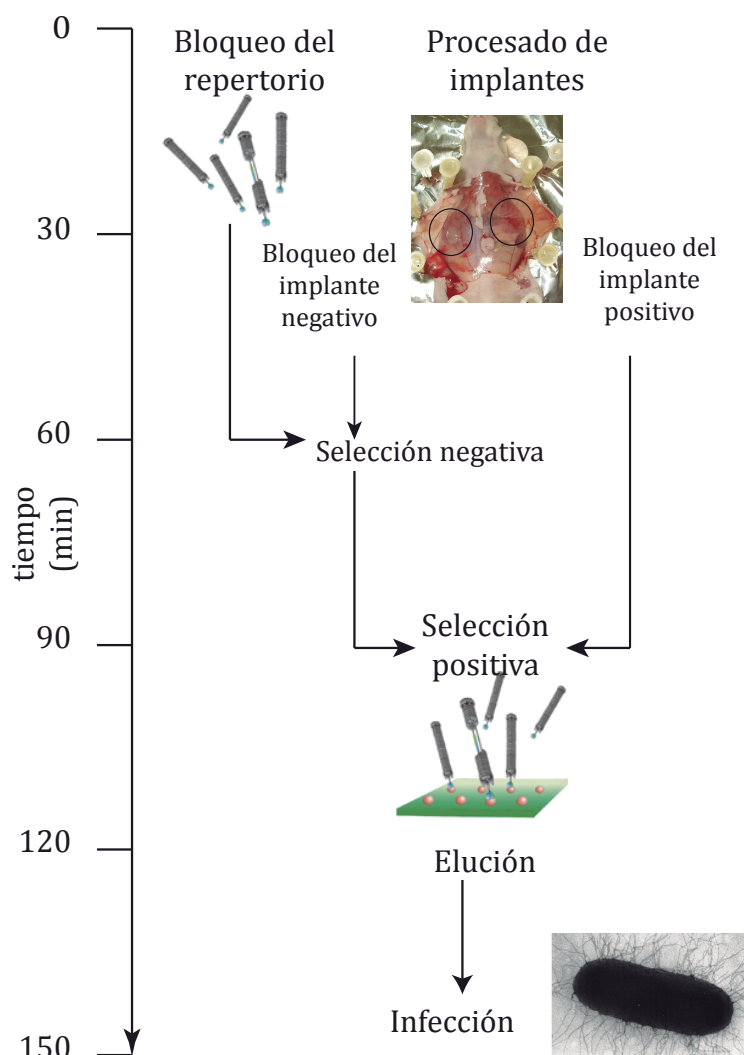


FIGURA 6. RESUMEN DEL PROCESO DE SELECCIÓN *EX VIVO* A PARTIR DEL MVH.

durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. Tras centrifugar, el sobrenadante —que contiene restos no precipitados del procesamiento del implante, así como fagos que no se han unido al componente celular y de matriz precipitable— se incuba con el componente celular del MVH. Tras 6 lavados con PBS, se resuspende el precipitado en 400 µl de la solución de elución de tripsina durante 20 minutos (Figura 6). Dado que la selección se realiza a temperatura ambiente y cabe la posibilidad de la internalización de fagos que interaccionen con la superficie celular, la centrifugación de

esta elución permite separar dos componentes: el que se halla en el sobrenadante, que corresponde a la fracción de fagos unidos a la superficie celular (o a componentes de la matriz que no se hayan disgregado completamente) —fracción extracelular— y la fracción intracelular, aún no eluida. Para obtener la fracción intracelular, el precipitado de células y componentes de la matriz final se lisan en 100 µl de una solución de (50 mM de Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,02% NaN_3 ; 0,1% Triton X-100) durante 10 minutos en agitación. Se suplementa con 300 µl de tripsina y se repite el proceso de elución. Las fracciones eluidas se neutralizan con 10 µl de FCS. La titulación, rescate y nueva producción de los fagos seleccionados se lleva a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.5.1.

III.5.2.1.2. *In vivo*

El repertorio preseleccionado *ex vivo* — 2×10^{11} partículas infectivas totales procedentes de la segunda ronda de selección *ex vivo*— es inoculado por vía intravenosa en animales portadores de implantes MVH en período de angiogénesis activa. Tras 10 minutos de circulación, los animales son sometidos a una perfusión intracardiaca exhaustiva (50 ml de una solución de DMEM suplementada con un 4% de BSA estéril —filtrada por 0,22 µm— y atemperada a 40 °C seguidos por 50 ml adicionales de PBS atemperado a un flujo de 1 – 2,5 ml/min) para eliminar las partículas virales no unidas del sistema circulatorio. El implante es disgregado mecánica y enzimáticamente para recuperar el componente celular, que es tripsinizado para eluir y rescatar mediante infección de un cultivo de *E. coli* las partículas virales adheridas de manera análoga al procesamiento *ex vivo*.

III.5.2.2. MODELO TUMORAL

III.5.2.2.1. *In vitro*

Para esta selección se emplean células cultivadas *in vitro*, a un 80-90% de confluencia, resuspendidas con 5 ml de una solución no enzimática y llevadas a un volumen de 50 ml con PBS. Se centrifugan las células y se resuspenden en medio completo a una densidad de 10^6 células por mililitro, que se mantienen en hielo hasta la selección. Mientras tanto, el repertorio es bloqueado en una solución de DMEM suplementado con 1% BSA. En tubos de polipropileno de 15 ml (BD Biosciences), se mezclan 9 ml de DMEM suplementado con un 1% de BSA, 1 ml de la suspensión celular y el reper-

torio (10^{12} partículas infectivas) durante 16 h en agitación continua a 4 °C. Se realizan 5 lavados con 10 ml de DMEM suplementado con un 1% de BSA, para lo cual, tras cada centrifugación, se resuspende el precipitado (células y restos celulares) en 1 ml y se transfiere a un tubo nuevo al que se añaden 9 ml adicionales de la solución de lavado. Tras el último lavado, se resuspende en 1 ml de PBS y se transfiere a un tubo de polipropileno de 1,5 ml. Se centrifuga y los fagos adheridos a la superficie celular se eluyen en 500 µl de PBS suplementado con 1 mg/ml de tripsina durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se neutraliza la tripsina añadiendo FCS hasta el 0,5%. El componente celular y el residuo restante se descartan por centrifugación a 14000 rpm en una centrífuga de mesa. A continuación se procede del modo descrito en el apartado III.5.1.

III.5.2.2.2. *Ex vivo*

Como diana en la selección *ex vivo* se emplea una suspensión del tejido que se obtiene tras la perfusión del animal bajo anestesia (Avertin, 0,4-0,75 mg/g de peso) con DMEM suplementado con un 1% de BSA. Se recogen los órganos seleccionados (tumor y otros órganos de referencia) y se disgregan suavemente empleando un homogeneizador de tejidos de Beckton Dickinson (Medimachine). El homogeneizado se ajusta a una concentración teórica de 30 mg/ml que se emplea (1 ml) para la selección de manera análoga a la selección *in vitro*.

III.5.2.2.3. *In vivo*

Los repertorios previamente enriquecidos se inoculan por la vena caudal a ratones portadores de tumor (100 µl de una suspensión de fagos de 10^{10} - 10^{12} unidades infectivas por mililitro). Durante un tiempo variable (entre 15 minutos y 24 h) se permite la libre circulación del repertorio por el torrente sanguíneo. Transcurrido el tiempo determinado, se anestesia al ratón y se perfunde exhaustivamente (50 ml de una solución de DMEM suplementada con un 4% de BSA (estéril —filtrada por 0,22 µm— y atemperada a 40 °C). Se extraen los órganos seleccionados (el tumor entero, el riñón situado en el flanco contrario al tumor, un fragmento de hígado, el corazón, un fragmento de pulmón y un fragmento de bazo), se lavan con profusión con PBS y se depositan en tubos de polipropileno de 15 ml para ser pesados. Se mantienen en hielo hasta que se añade la solución de lisis (2 ml de PBS suplementado con 1% de NP40 y 1 mg/ml de tripsina). Se homogeneiza empleando un homogeneizador OmniTH con

vástagos lavados con hipoclorito de sodio 10% y autoclavados. Se mantiene a temperatura ambiente 30 minutos para permitir la tripsinización, se emplea 0,1 ml para la titulación por infección de diluciones seriadas y se recupera el total de fagos eluidos con 8 ml de un cultivo en crecimiento exponencial de *E. coli* TG1TR.

III.5.2.2.3.1. Ensayos de competición

Los ensayos de competición se realizan de manera análoga a la selección *in vivo*. La diferencia estriba en el repertorio inoculado: en lugar de ser un repertorio enriquecido procedente de rondas previas, está formado por una mezcla definida de un número determinado de clones (generalmente entre 4 y 10). El objetivo de estos ensayos es, conocida la mezcla inoculada (cantidad y proporción), evaluar la población recuperada del órgano de interés y compararla con la obtenida de órganos de referencia.

La selección de los clones se realiza conforme a una combinación de los siguientes parámetros:

1. Secuenciación, para cada ronda de selección de:
 - 1.1. Repertorio enriquecido inicial (95 clones).
 - 1.2. Tumor (95 clones).
 - 1.3. Órganos (96 clones, repartidos entre riñón, hígado, corazón —24 clones de cada órgano— y pulmón y bazo —12 clones—).
2. Consulta de la base de datos Vbase2: identificación de codones de parada (ámbar) y generación de árboles filogenéticos (semejanzas y abundancia relativa, secuencias consenso entre grupos, etc.).
3. Comparación entre el repertorio inicial y los obtenidos de tumor y órganos (presencia/ausencia y frecuencia relativa).
4. Semejanza entre la composición de los CDR y la composición de la secuencia consenso para su grupo ($CS = (2 \times c_1 + 2 \times c_2 + 1 \times c_3)$ [c_1 -3: residuos comunes en los CDR₁₋₃]).
5. Análisis de la primera base tras los posibles codones ámbar (AAS = 0,3*T/C; 0,6*A/G).

6. Inclusión de parámetros fisicoquímicos de la proteína teórica (predicción empleando la secuencia obtenida —eliminando el péptido líder— en las herramientas de la base de datos ExPASy: número de cisteínas, punto isoelectrico, índice de hidrofobicidad).

7. Presencia de motivos conocidos (RGD, CendR, NGR, CREKA,...).

III.5.2.2.3.2. Ensayos de localización

Los ensayos de localización tienen como objetivo determinar la capacidad de un fago monoclonal para localizarse en el órgano diana. El procedimiento es análogo a la selección *in vivo*, pero empleando una población purificada de uno de los fagos monoclonales candidato, evitando así la competición entre distintas especificidades. Se realiza en varios grupos de ratones (tantos como candidatos más controles) a los que se administra la misma cantidad de fago. Tras la perfusión, la mitad del órgano se emplea para la cuantificación de partículas infectivas (titulación) y la otra mitad se embebe de inmediato en el medio de inclusión OCT, que se sumerge en isopentano enfriado con nitrógeno líquido para conservar las muestras hasta la realización del análisis correspondiente por inmunohistoquímica.

III.5.2.2.4. Identificación de la diana

A partir de tres tumores de 0,5 cm³ se obtiene un lisado tumoral, para lo cual las piezas se disgregan y homogeneizan en tampón de lisis (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 137 mM NaCl; 10% glicerol; 1% NP-40; 2 mM EDTA) al que se añaden, inmediatamente antes del procesamiento, PMSF (ajustado a una concentración final de 1 mM) y una mezcla de inhibidores de proteasas comercial (Roche). El lisado se hace circular a través de las columnas de sefarosa con los anticuerpos conjugados siguiendo un esquema en serie: el lisado pasa primero por la columna con el anticuerpo frente a β -galactosidasa, que está conectada a la columna con el anticuerpo DAb₀₅ la cual, a su vez, se conecta con la columna del anticuerpo DAb₁₀. El objetivo de este esquema es doble: por una parte emplear la primera columna de control como filtro para las interacciones inespecíficas no mediadas por el sitio de unión del anticuerpo y, por otra, optimizar el material disponible (al emplear un mismo lisado para el equivalente de tres purificaciones). La elución del material retenido en las distintas columnas se realiza pausando el sistema, desacoplando las columnas —excepto la columna de anti-

β -galactosidasa—, lavando con PBS e inyectando 3 ml del tampón de elución. A continuación, se reanuda el flujo hasta que todo el volumen de la columna se haya eluido. En ese momento se repite el proceso, acoplando esta vez la columna con el anticuerpo DAb₀₅ y, al concluir con ésta, de nuevo otra vez con la columna con el anticuerpo DAb₁₀.

El volumen eluido de cada columna se divide en tres alícuotas que se liofilizan hasta su uso. La muestra liofilizada se resuspende en 30 μ l de bicarbonato amónico 50 mM, en frío. De cada una se emplean 7,5 μ l para analizar por SDS-PAGE (12% acrilamida) y el gel se tiñe con SYPRO o con plata para seleccionar las bandas que se envían a la trampa iónica.

III.5.3. EVALUACIÓN DE LAS SELECCIONES

III.5.3.1. INFORMACIÓN DE SECUENCIAS

Para la evaluación de las distintas selecciones se han empleado diferentes aproximaciones. La más intuitiva e inmediata es la relación entre la cantidad de partida del fago y la cantidad obtenida tras la selección (ratio *output / input*). Para estimar la diversidad de los repertorios que no comparten una secuencia consenso es posible emplear una enzima de corte frecuente (BstN1) sobre el producto de PCR (cebadores, LMB3 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'; FdSeq1, 5'-GAA TTT TCT GTA TGA GG-3'; aprox. 1000 bp para el repertorio Griffin.1 de *scFv*), de manera que se obtienen distintos perfiles de migración en un gel de agarosa para los diferentes clones presentes. Sin embargo, un mismo perfil de migración puede proceder de secuencias distintas y esta estrategia no es aplicable en aquellos casos en los que se comparte la secuencia consenso original (DAb, Tomlinson,...), por lo que la manera más fiable de estudiar la diversidad es la secuenciación, que proporciona, además, otro tipo de datos adicionales. Las secuencias obtenidas pueden ser analizadas manualmente o en una base de datos como Vbase2 (<http://www.vbase2.org>; [Retter *et al.* 2005]) que facilita información acerca del tipo de cadena presente, composición de los bucles de los CDR, segmento germinal asociado, presencia de codones de parada, etc.

En los casos en los que se cuenta con proteína purificada frente a la que analizar la especificidad del repertorio, se realiza un ELISA de fago policlonal (para evaluar el conjunto de la selección) o de fago monoclonal (para evaluar la especificidad de cada uno de los clones identificados), conforme al protocolo habitual en esta tecnología [Jensen y Kristensen 2005].

Conocida la abundancia relativa de los CDR en el repertorio original y en las rondas de selección, el criterio de decisión por excelencia es seleccionar aquellas combinaciones de todos los CDR de una cadena que se repiten frecuentemente tras las rondas de selección. A continuación, se escogen aquellos clones en los que se observa una repetición frecuente de alguno de los CDR y, por último, se evalúan otros parámetros como: desvíos en la frecuencia esperada de aminoácidos en los CDR; existencia de combinaciones de aminoácidos características; presencia de codones ámbar y cuál es el nucleótido siguiente al codón de parada. Asimismo, se establecen grupos jerárquicos en función de la similitud —obtenida como una filogenia empleando el programa Jalview [Waterhouse *et ál.* 2009]—, y se determinan las secuencias consenso dentro de cada grupo jerárquico que se comparan con cada una de las secuencias individuales.

III.6. OBTENCIÓN DE LOS ANTICUERPOS RECOMBINANTES

III.6.1. FORMATO MONOMÉRICO

Los anticuerpos en formato monomérico, bien *scFv*, bien DAb, se purifican a partir de la preparación de periplasma de cultivos de *E. coli* HB2151 inducidos con IPTG 1 mM durante 16 h a 25 o 30 °C. La purificación se realiza directamente del material obtenido por cromatografía de afinidad usando columnas de alta capacidad de

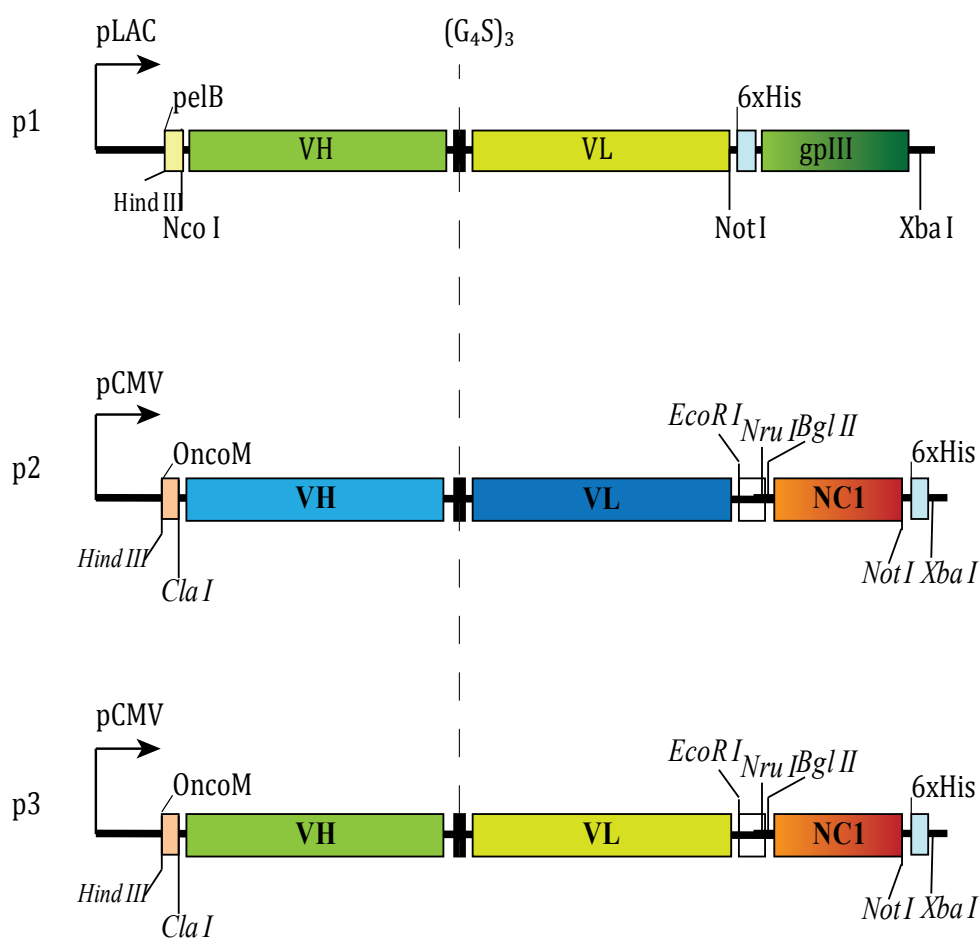


FIGURA 7. PLÁSMIDOS EMPLEADOS PARA LA OBTENCIÓN DEL TRIMERBODY 2.15.

p1: pHEN2-2.15, plásmido original del repertorio en el que el anticuerpo se encuentra separado de la proteína III del fago por un codón ámbar. p2: pCR3.1-L36-NC1, plásmido que contiene la estructura básica de un *trimerbody* tipo. p3: pCR3.1-2.15-NC1, la región codificante procedente de p1 se amplifica por PCR con unos cebadores que incorporan las dianas *ClaI* y *EcoRI*, para poder introducirla por digestión con las enzimas de restricción en el esqueleto de p2 [Cuesta y Álvarez Vallina 2009].

proteína A acoplada a sefarosa (todos los DAb y los *scFv* L36 y 2.15) o por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados en columnas con Ni²⁺ inmovilizado a partir del material dializado (todas las columnas se obtienen de GEHealthcare).

III.6.2. TRIMERBODY

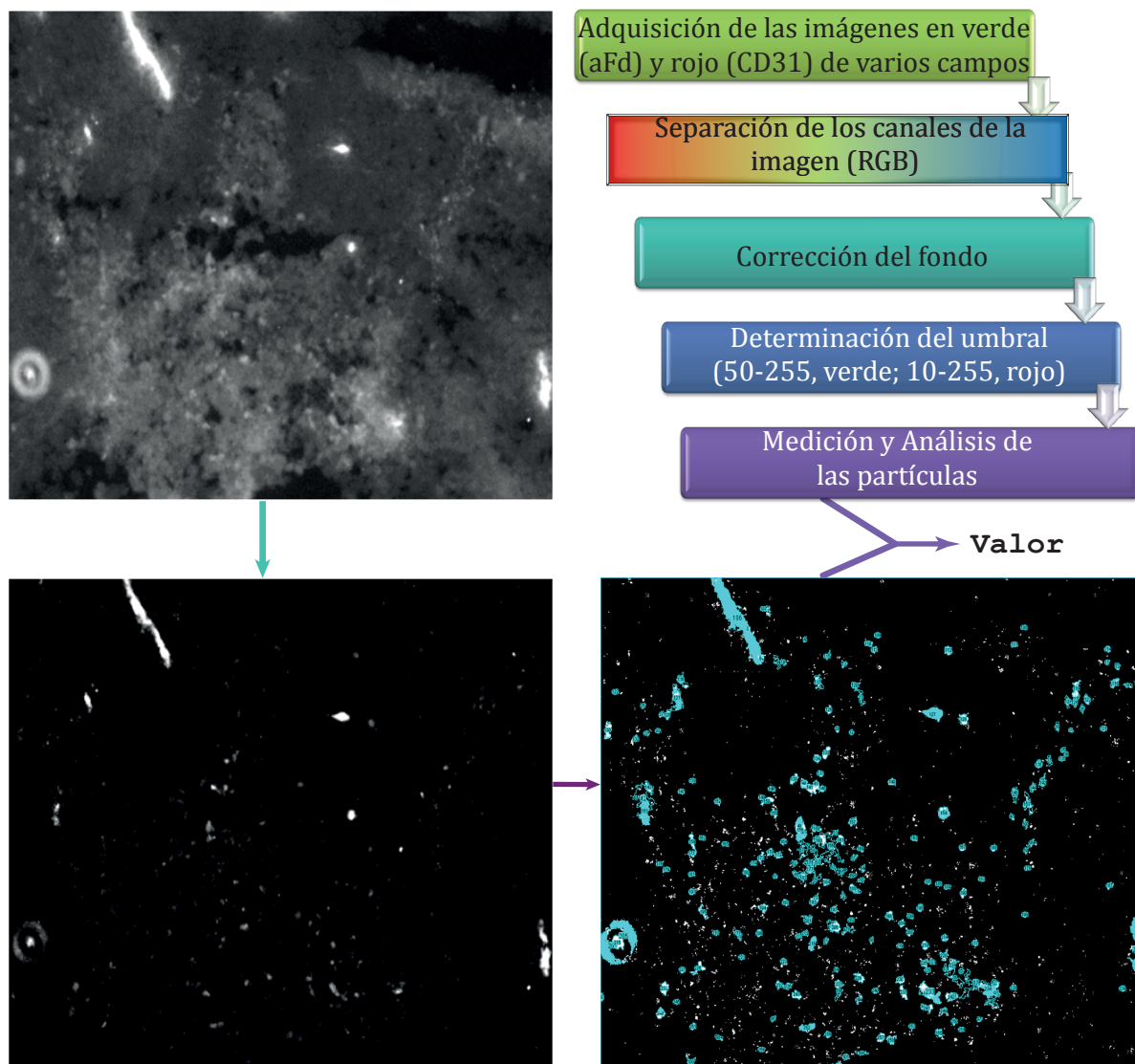
Los anticuerpos en formato trimérico se han purificado a partir del sobrenadante de células HEK-293 seleccionadas con 0,5 mg/ml de neomicina (G418, Promega) tras la transfección con el plásmido pCR3.1-2.15-NC1 (Figura 7) o con 100 µg/ml de higromicina B (Invitrogen) en el caso del plásmido pBEL2-linker-NC1^{ES} [Cuesta y Álvarez Vallina 2009].

III.7. INMUNOHISTOQUÍMICA/IF

Las tinciones se realizan siguiendo un protocolo estándar. Se atemperan las preparaciones durante cinco minutos a temperatura ambiente; se equilibran durante dos minutos en PBS y se dejan secar al aire; se delimita la región con un rotulador hidrofóbico (*PAP pen*, Invitrogen); se fija durante 15 minutos en paraformaldehído al 4% en PBS y se permeabiliza durante 15 minutos en PBS suplementado con el 0,1% de Triton-X100; se equilibra durante dos minutos en PBS y se bloquea 45 minutos en una solución de bloqueo (en general, 1% de BSA, 7,5% de suero de cabra); se incuba con la dilución correspondiente del anticuerpo primario a 4 °C durante 16 h (en general, 10 µg/ml) y se lava tres veces en PBS durante 15 minutos cada vez; se incuba con el anticuerpo secundario correspondiente durante 45 minutos; se repiten los lavados y se incuba con el marcador de núcleos To-Pro3 (Invitrogen); la preparación se termina con un medio de montaje que solidifica y que contiene DAPI.

III.7.1. CUANTIFICACIÓN

La cuantificación de las diferencias observadas se realiza a partir de imágenes adquiridas con un microscopio equipado con una unidad de epifluorescencia (Nikon Eclipse Ti, Nikon Corp.). De cada sección se adquieren imágenes de diez campos aleatorios distintos y no superpuestos —excluyendo el borde del tumor— en los canales deseados (verde y rojo, correspondientes a Alexa-488 y a Alexa-546), que son procesadas con el programa ImageJ [Abramoff *et al.* 2004] para obtener dos valores correspondientes al área positiva para cada par de imágenes: una que relaciona el área total considerada



```

run("Subtract Background...", "rolling=10 sliding disable");
//run("Threshold...");
setAutoThreshold("Default dark");
setThreshold(10, 255); setThreshold(50, 255);
run("Analyze Particles...", "size=50-Infinity circularity=0.00-1.00
show=[Overlay Outlines] display summarize record in situ");

```

FIGURA 8. PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES ADQUIRIDAS.

De cada campo se adquieren dos imágenes, una correspondiente a la tinción del fago y otra correspondiente a la tinción del marcador endotelial. Se separan los canales RGB de las imágenes adquiridas y se seleccionan los específicos para cada una de las tinciones. Se aplica el código que aparece bajo las imágenes para sustraer el fondo, establecer el valor umbral y medir y cuantificar las partículas. De cada par de fotos se obtienen tres valores: el área total positiva que aparece teñida con fago (aFd), el área total positiva teñida para CD31 (aCD31) y un valor que relaciona ambas áreas ($V = aFd / aCD31$).

positiva y otra que proporciona la intensidad media de la imagen (el procesamiento de las imágenes se resume en la Figura 8). Así, de cada sección se obtienen diez valores que se emplean posteriormente en el análisis estadístico.

III.8. ESTADÍSTICA

La existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos se evalúa por medio de tests no paramétricos. Para la elección del test estadístico más apropiado, se evalúan las asunciones de normalidad en la distribución y de homocedasticidad. Los pequeños tamaños muestrales correspondientes a grupos de datos con pocas observaciones impiden que se cumplan estos requisitos en todos los casos, lo que desaconseja la utilización de pruebas paramétricas. Por lo tanto, se ha empleado el test de Kruskal-Wallis para estudiar las diferencias entre todos los grupos y el test U de Mann-Whitney en la evaluación de las diferencias entre cada par de grupos. Ambos tests son análogos no paramétricos al análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y evalúan la hipótesis nula de que dos (Mann-Whitney) o más (Kruskal-Wallis) muestras proceden de la misma población. Estas comparaciones se han representado visualmente por medio de diagramas de cajas que proporcionan información sobre la tendencia central, dispersión y simetría de la distribución asociada a cada grupo, así como sobre la presencia de valores atípicos. Tanto el análisis estadístico de los datos como su representación gráfica por medio de los diagramas de cajas se llevan cabo con el programa *Statistical Package for the Social Sciences 19* (SPSS, IMB Corporation) junto con la extensión XLStat para MS Excel.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

“Después de algunos asaltos infructuosos, no renuncies, no insistas. Pero guarda ese problema en las bodegas de tu mente, donde irá mejorando. Cambiad, ambos.”

Paul Valéry.

IV.1. P32

IV.1.1. RONDAS DE SELECCIÓN

Se ha empleado el repertorio Griffin.¹ para seleccionar anticuerpos recombinantes en formato de fragmento variable de cadena única (*scFv*) frente a la proteína p32 inmovilizada. El porcentaje de anticuerpos que se unen a la proteína diana se incrementa de un 20% en la primera ronda a un 60% en la segunda ronda de selección (Figura 9). El análisis de las secuencias por digestión con la enzima de corte frecuente BstN1 de 24 clones seleccionados (por un ratio de la señal frente a p32 / señal frente a BSA ≥ 3) sugería 16 patrones de restricción diferentes para anticuerpos completos, que se verificaron posteriormente por secuenciación (Figura 9b y Tabla 5). El uso de segmentos

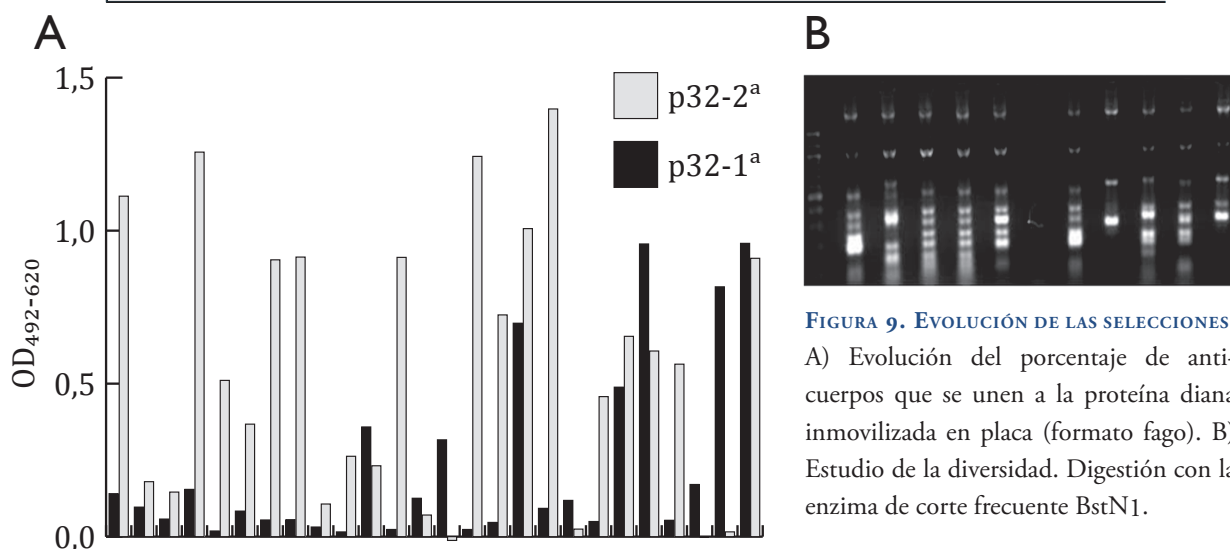


FIGURA 9. EVOLUCIÓN DE LAS SELECCIONES.
A) Evolución del porcentaje de anticuerpos que se unen a la proteína diana inmovilizada en placa (formato fago). B) Estudio de la diversidad. Digestión con la enzima de corte frecuente BstN1.

observados, así como la longitud del CDR3 de la V_H , se corresponde con el uso en los anticuerpos nativos [Tomlinson *et ál.* 1992]; el segmento predominante V_L se halla también bien representado en otros repertorios.

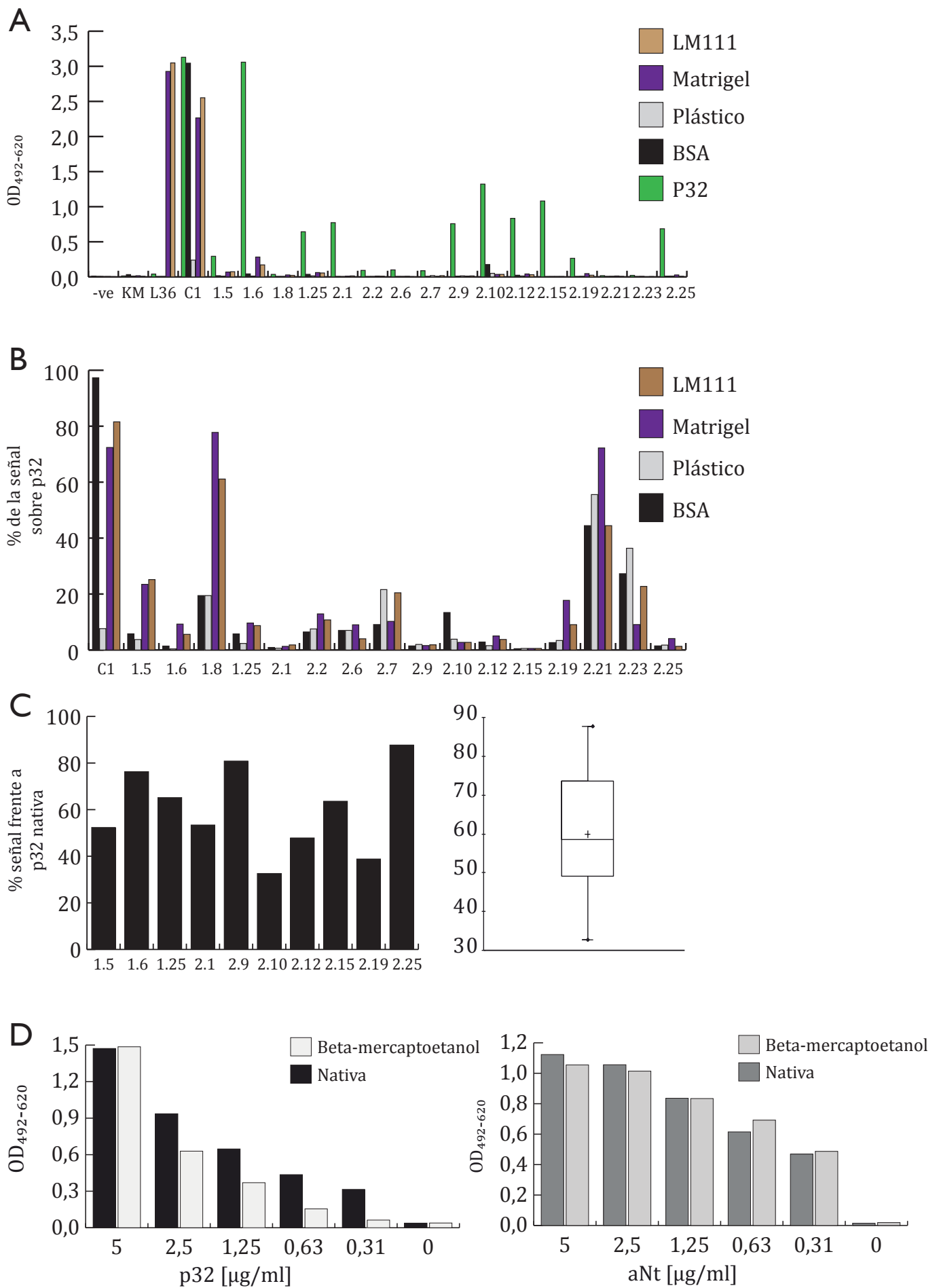
La especificidad de los anticuerpos completos —y carentes de codones ámbar en su secuencia— se analizó por ELISA frente a otras proteínas no relacionadas, y frente a elementos presentes en el proceso de selección (Figura 10a,b). A continuación, se estudió la dependencia conformacional de los clones seleccionados frente a p32 nativa o desnaturizada por calor en presencia de un agente reductor (β -mercaptoetanol). El proceso de desnaturalización no afecta a la inmovilización de la proteína en la placa de ensayo, ni a la detección por el anticuerpo policlonal dirigido frente a una secuencia lineal expuesta en la región amino terminal de la proteína (Figura 10d). Sin embargo, la detección de la proteína por el panel de anticuerpos seleccionados disminuye al 59,9% (SD 18,1) (Figura 10c). Es frecuente que los anticuerpos seleccionados de este tipo de repertorios sean muy dependientes de la conformación del epítipo, por lo que este descenso no es sorprendente [Fu *et ál.* 1997; Chung *et ál.* 2008; Wang *et ál.* 2009].

TABLA 5. SECUENCIA GERMINAL Y USO DE CDR EN LOS ANTICUERPOS SELECCIONADOS.

Clon	VH	CDR1	CDR2	CDR3	Segmento	VL	CDR1	CDR2	CDR3	Segmento
1.5	IGHV ₃	GFTFSSYA	ISGSGGST	TRARRR	DP-47	IGLV1	SSNIGSNY	RNN	AAWDDSLRGPV	DPL ₃
1.6	IGHV1	GFTFTSSA	IAVGSGNT	ARVSPSSPAARRLV	DP-2	IGLV1	SSNIGSNY	RNN	AAWDDSLSARV	DPL ₃
1.8	IGHV1	GYTFTNYC	VCPSDGST	ARVAGNRKY		IGLV ₃	SLRSYY	GKN	NSRDSSGTV	
1.25	IGHV ₄	GGSISSSNW	IYHSGST	ARTRSPRPSYI	DP-70	IGLV ₃	SLRSYY	GKN	NSRDSSGNHV	DPL16
2.1	IGHV ₃	GFTFSSYG	ISYDGSNK	ARNTKAVRV	DP-49	IGLV ₃	SLRSYY	GKN	NSRDSSGGWGTV	DPL16
2.2	IGHV ₃	GFTFSSYG	ISYDGSNK	ARNGNRRVS	DP-49	IGLV ₃	SLRSYY	GKN	NSRDSSGRWKV	DPL16
2.6	IGHV ₃	GFTFSSYA	ISYDGSNK	ARHKRRRE		IGLV1	SSNIGNNY	DNN	GTWDSSLRSSV	
2.7	IGHV ₃	GFTFSSYG	ISGSGGST	ARRVRTL		IGLV ₃	SLRSYY	GKN	NSRDSSGTGNV	
2.9	IGHV ₃	GFTFSSYG	ISYDGSNK	ARSLRSTRT	DP-49	IGLV1	SSNIGSNY	RNN	AAWDDSLTPV	DPL ₃
2.10	IGHV ₃	GFTFSDYY	ISSSGSTI	ARKSRRGRLV	DP-35	IGLV ₃	SLRSYY	GKN	NSRDSSGTV	DPL16
2.12	IGHV ₃	GFTFSSYA	ISGSGGST	ARLARRERMRL	DP-47	IGLV ₃	SLRSYY	GKN	NSRDSSGKRRV	DPL16
2.15	IGHV ₃	GFTFSSYG	ISYDGSNK	ARNLRHEKQ	DP-49	IGLV1	SSNIGSNY	RNN	AAWDDSLFV	DPL ₃
2.19	IGHV ₃	GFTFSSYG	ISYDGSNK	ARRTTRGHLR	DP-49	IGLV ₃	SLRSYY	GKN	NSRDSSGV	DPL16
2.21	IGHV ₃	GFTFSSYA	ISGSGGST	ARRPSPGHRALV		IGLV ₃	SLRSYY	GKN	NSRDSSGHSV	
2.23	IGHV ₃	GFTFDDYG	INWNGGST	ARMHELKFDY	DP-32	IGLV1	SSNIGSNY	RNN	AAWDDSLPVV	DPL ₃
2.25	IGHV1	GYTFTSYG	ISAYNGNT	ARLHHS	DP-14	IGLV1	SSNIGSNY	RNN	AAWDDSLTMPV	DPL ₃

La asignación de las secuencias germinal V_H y V_L se ha realizado mediante la base de datos VBase2 [Retter *et al.* 2005].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



En la página anterior:

FIGURA 10. ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS SELECCIONADOS EN FORMATO DE FAGO.

A) ELISA frente a distintas dianas irrelevantes (LM111, laminina). B) Porcentaje de la señal obtenida frente a p32 inmovilizada obtenida con distintas dianas irrelevantes. C) Dependencia conformacional de la interacción entre los fagos-*scFv* (seleccionados en función de su especificidad) y la proteína diana: porcentaje de la señal obtenida al estudiar por ELISA la interacción con una preparación de p32 con 220 mM de β -mercaptoetanol hervida a 110 °C durante 30 min respecto a la interacción con una preparación de proteína nativa (izquierda); promedio de la reducción de la señal para los distintos clones (derecha). D) Las diferencias obtenidas no parecen deberse a que el proceso de desnaturalización afecte a la inmovilización en placa, a tenor del comportamiento del anticuerpo policlonal frente a la proteína nativa y desnaturalizada: detección usando una cantidad constante de anticuerpo policlonal (5 μ g/ml) y concentraciones decrecientes en el recubrimiento de los pocillos (izquierda); detección usando una concentración constante (5 μ g/ml) de recubrimiento y concentraciones decrecientes del anticuerpo policlonal usado como primario (derecha).

IV.1.2. EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS SELECCIONADOS Y ELECCIÓN DE CANDIDATOS

A menudo, el comportamiento observado en los anticuerpos difiere al ser expresado como proteína soluble (*scFv*) o como proteína de fusión asociada a la proteína III del fago —que actúa a modo de chaperona, al tiempo que se incrementa la detección por el efecto multiplicador de la proteína VIII del fago—. Por ello, se estudió la producción de anticuerpo soluble —a partir de *E. coli* HB2151 infectadas con el fago

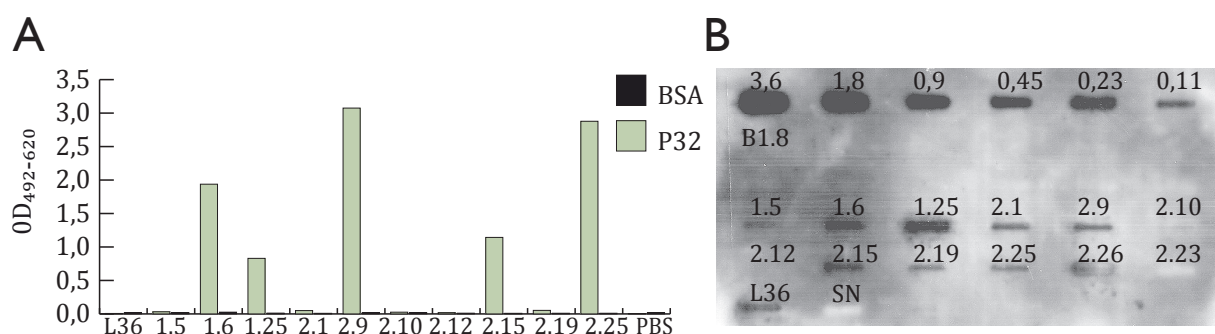


FIGURA 11. EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS SELECCIONADOS EN FORMATO SOLUBLE (INDUCCIÓN Y REACTIVIDAD).

A) Comportamiento de los anticuerpos seleccionados en formato soluble (*scFv*). B) *Dot-blot* del sobrenadante de células HB2151 estimuladas con IPTG. En la parte superior se muestran cantidades decrecientes de un *scFv* de control (en μ g). En la parte inferior se muestran los niveles de secreción de los clones seleccionados (2.10 y 2.12 no son detectados, el resto de clones se produce en cantidades entre 1 y 10 μ g/ml).

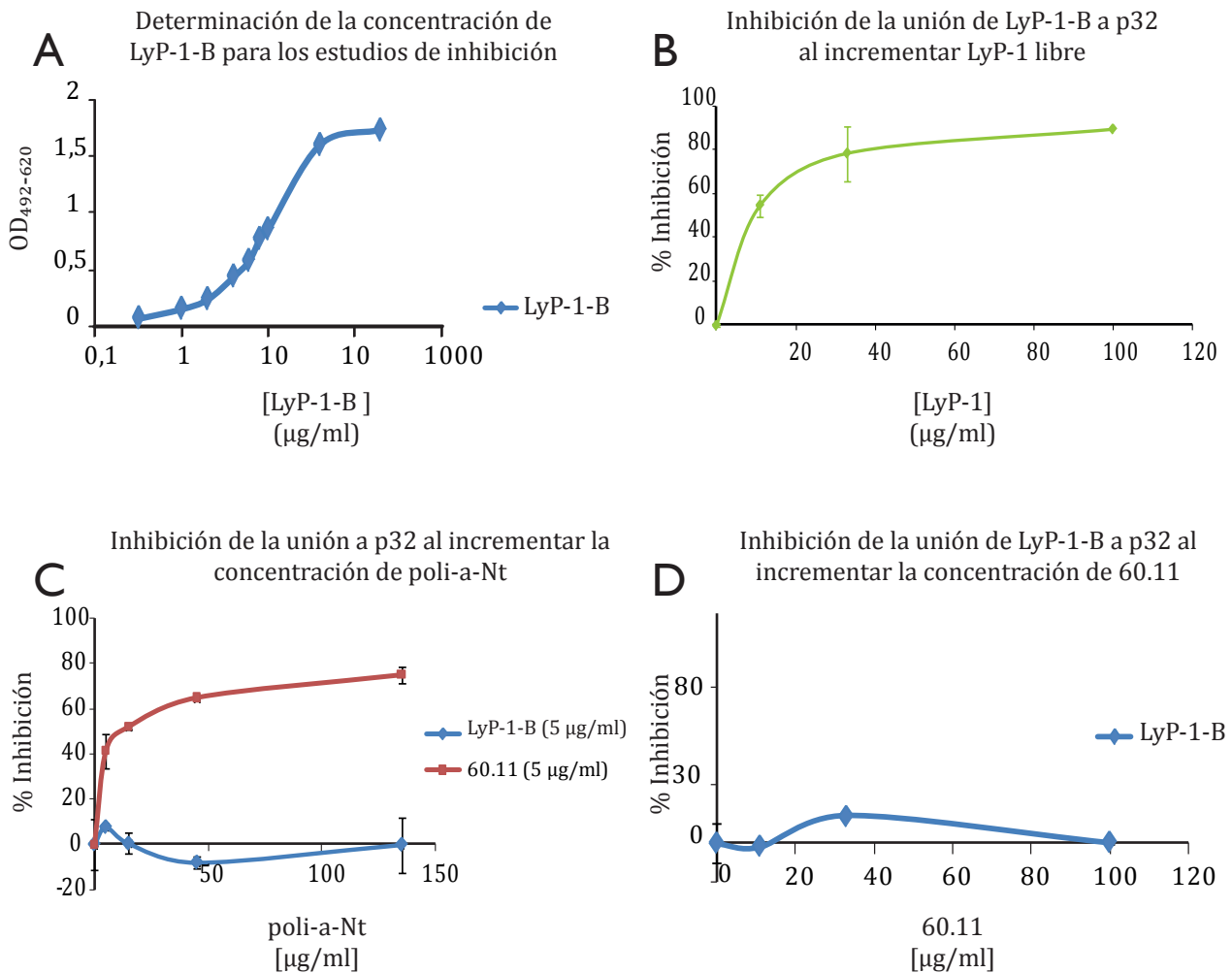


FIGURA 12. ENSAYOS DE COMPETICIÓN ENTRE EL PÉPTIDO LYP-1 Y ANTICUERPOS FRENTE A P32.

A) Determinación de la concentración de LyP-1-B para realizar los ensayos de inhibición ($5 \mu\text{g/ml} \equiv 4 \mu\text{M}$). B) Inhibición entre el péptido biotinilado y el péptido no conjugado. C) Inhibición entre el anticuerpo policlonal dirigido frente a la región amino terminal (poli-a-Nt) y el anticuerpo monoclonal 60.11. D) Inhibición entre el péptido biotinilado y el anticuerpo monoclonal.

monoclonal— y la especificidad mediante *dot-blot* y ELISA. Sólo se detectó la expresión de ocho de los diez clones inducidos y, de ellos, sólo cinco (1.6, 1.25, 2.9, 2.15 y 2.25) mantuvieron la capacidad de interaccionar con la proteína inmovilizada.

Con el objetivo de identificar aquellos anticuerpos cuyo epítipo coincidiese con la región de interacción de LyP-1, se diseñó una estrategia de identificación basada en la competición con el péptido LyP-1 biotinilado (Figura 12). Se estudió la inhibición de la unión del péptido biotinilado a p32 empleando como agentes competidores el péptido libre, el anticuerpo monoclonal 60.11, el anticuerpo monoclonal 74.5.2 o el anticuerpo policlonal de conejo frente a la región N-terminal de p32.

Para estudiar la inhibición producida por los distintos agentes y el péptido soluble (LyP-1-B), se ha determinado una cantidad constante de p32 inmovilizada (0,5 μ g) y una concentración de 5 μ g/ml de LyP-1-B (equivalente a 4 μ M), valores que se sitúan en la parte inicial del tramo de interacción lineal (Figura 12a). Con esas condiciones, al competir con 10 μ g/ml (10 μ M) de péptido no conjugado se obtiene una inhibición del 50%, que aumenta hasta el 95% al incrementar la concentración de agente competidor a 25 veces la del péptido biotinilado (Figura 12b). Se comprueba que se obtiene el mismo tipo de inhibición entre el anticuerpo monoclonal 60.11 y un anticuerpo policlonal dirigido frente a la región N-terminal (Figura 12c). Sin embargo, aparentemente no hay competición entre el péptido soluble y los anticuerpos dirigidos frente a la región N-terminal (Figura 12d). Como alternativa, se ha empleado una estrategia de selección basada en la competición con el anticuerpo monoclonal 60.11, dado que en la literatura se describe tanto la capacidad de competición con el fago que expresa el péptido LyP-1 en su superficie como el efecto antitumoral en ratones portadores de tumor [Fogal *et ál.* 2008]. Sólo se han estudiado aquellos anticuerpos que, en formato soluble, se expresan y son capaces de interaccionar con la proteína inmovilizada.

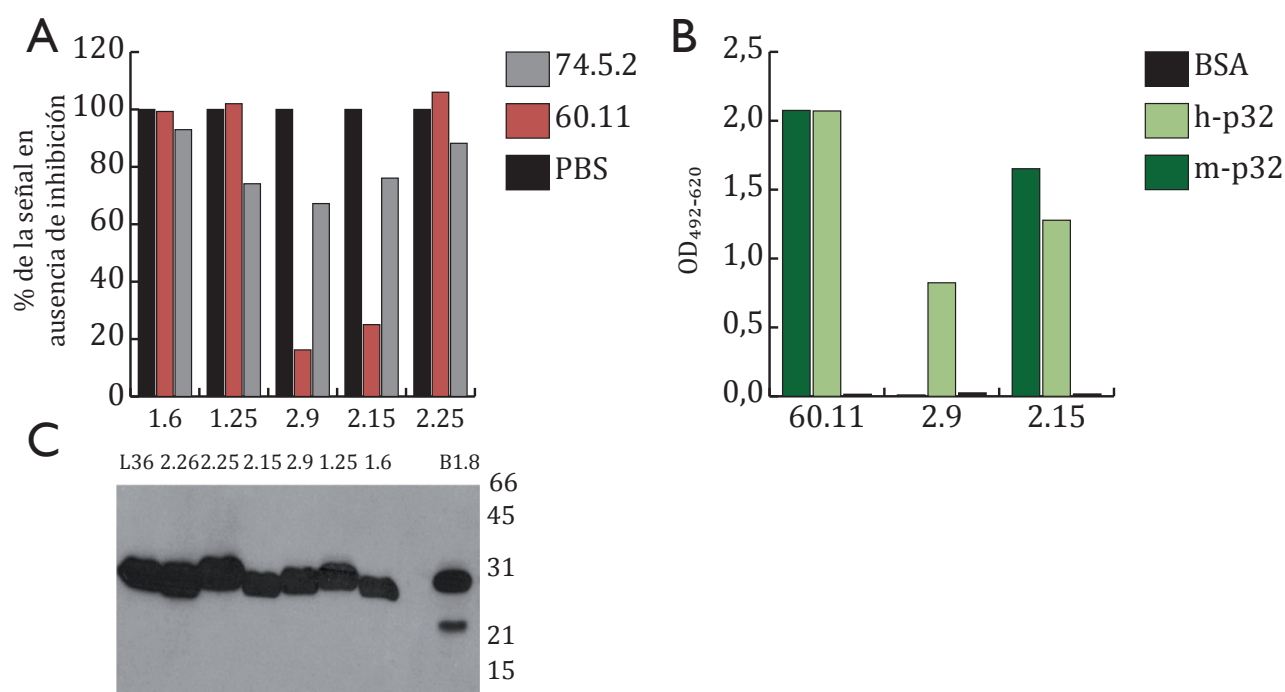


FIGURA 13. EVALUACIÓN DEL FORMATO SOLUBLE (INHIBICIÓN Y ESPECIFICIDAD).

A) Inhibición de la interacción mediada por los anticuerpos monoclonales 60.11 y 74.5.2. B) Especificidad de especies de los anticuerpos seleccionados (*scFv*); h-p32: p32 humana; m-p32: p32 murina. C) *Western Blot* de los *scFv* empleados en los ensayos de inhibición y posteriores.

A partir de esta información, se decide continuar el estudio empleando dos clones (2.9 y 2.15) cuya unión es desplazada por la presencia del anticuerpo monoclonal 60.11 —y, por tanto, susceptibles de unirse al mismo epítipo—, y un clon (1.6) independiente (Figura 13a). Dado el alto grado de homología entre la proteína humana

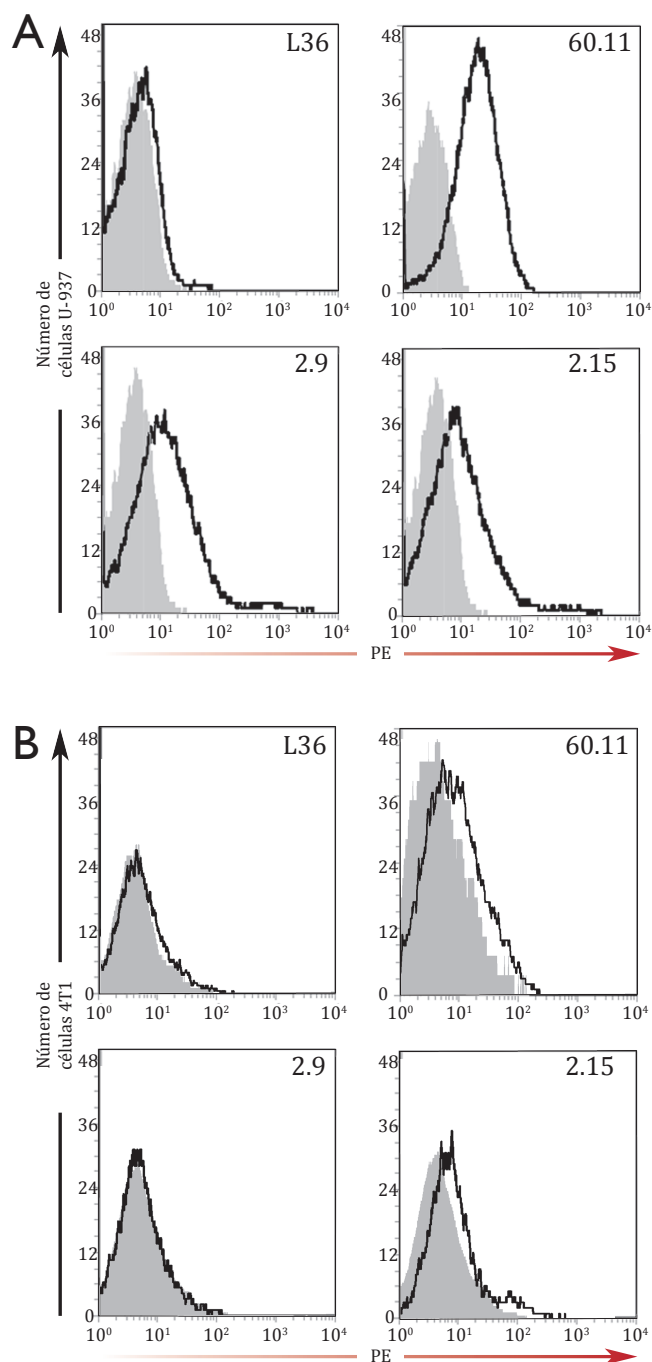


FIGURA 14. ESTUDIO POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LA CAPACIDAD DE RECONOCIMIENTO DE LA PROTEÍNA NATIVA EN SUPERFICIE DE LOS ANTICUERPOS SELECCIONADOS (*scFv*) FRENTE A UNA LÍNEA DE ORIGEN HUMANO (A) O MURINO (B).

(UniProt: Q07021) y la murina (UniProt: O35658) —con más del 85% de identidad en la secuencia completa, y del 90% en la proteína madura— se analizó la capacidad de los anticuerpos seleccionados para detectar ambas proteínas (Figura 13b).

Dado que el objetivo planteado en el trabajo se basa en la evaluación de los anticuerpos seleccionados frente a este antígeno multicompartimental en un modelo tumoral, no basta con la capacidad de reconocer la proteína inmovilizada, sino que es preciso que reconozcan la proteína nativa en el contexto celular en el que se va a encontrar en el tumor. Para determinar los niveles de expresión en la superficie celular, se ha realizado un estudio de la capacidad de detección del antígeno en superficie, empleando una línea celular humana (U-937 estimulada con PMA) y una línea celular murina (4T1), que expresan p32 en la superficie (Figura 14). En el análisis por citometría de flujo, el anticuerpo recombinante 2.15 se comporta de manera análoga al anticuerpo monoclonal 6O.11, ya que reconoce un porcentaje similar de células en ambas poblaciones. El anticuerpo recombinante 2.9, en cambio, reconoce un porcentaje equivalente en la línea celular humana, pero no identifica ninguna población positiva en la línea celular murina.

IV.1.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOCALIZACIÓN TUMORAL DEL ANTICUERPO ANTI-P32 2.15

Para el estudio *in vivo* de localización tumoral de los anticuerpos recombinantes se ha empleado el clon 2.15, debido al comportamiento descrito en el apartado previo, así como un anticuerpo ya validado en el laboratorio (L36, reconoce laminina LM111) y un anticuerpo control que reconoce el hapteno NIP (B1.8). Los anticuerpos recombinantes se purificaron a partir de la preparación de periplasma de un cultivo de *E. coli* HB2151. En la Figura 15 se muestra un cromatograma de una purificación representativa, así como la pureza del producto obtenido. Tras la conjugación con la cianina-5 (ratio *scFv*:Cy5 entre 1:1 y 1:2), el anticuerpo conjugado se separa de la cianina no conjugada empleando una columna PD-10, tal y como se muestra en la Figura 15c. Al ser administrados por vía sistémica a ratones inmunodeficientes portadores de tumores derivados de la línea tumoral humana MDA-MB-231 (cáncer de mama), se observa una rápida acumulación en el tumor transcurridas 2,5 h desde la inoculación del anticuerpo en el caso del *scFv* 2.15 y del L36, pero no del *scFv* B1.8 (Figura 16a). La fluorescencia acumulada en el tumor del ratón que recibió el anticuerpo 2.15 es aproximadamente 10 veces superior a la obtenida del ratón que recibió el anticuerpo de control (Figura 20). Al examinar la fluorescencia de los órganos *ex vivo*, se comprueba la localización tumoral de estos anticuerpos, al tiempo que se observa una marcada acumulación renal —concordante con la fluorescencia observada en la vejiga y con el tamaño molecular— (Figura 16b, c).

Con el objetivo de mejorar la relación entre la señal del tumor y la señal de la sangre (fondo), se ha empleado un formato trimérico (*Trimerbody*), purificado del medio de cultivo condicionado de células HEK-293 que mantienen de manera estable el plásmido pCR3.1-2.15-NC1 (Figura 17, detalle). El trímero conserva la especificidad del anticuerpo monovalente (Figura 17), pero con una mayor afinidad funcional (avidez) —al tiempo que se aumenta su vida media en sangre al superar el tamaño del umbral de filtración renal—. Estas mejoras permiten un período de seguimiento más largo y una mejor localización del tumor en todos los tiempos estudiados (Figura 18).

Los estudios de distribución y de localización tumoral se realizaron en ratones atímicos desnudos en los que se implantaron ortotópicamente tumores de mama de origen humano. El *trimerbody* 2.15 localizó específicamente los tumores formados por

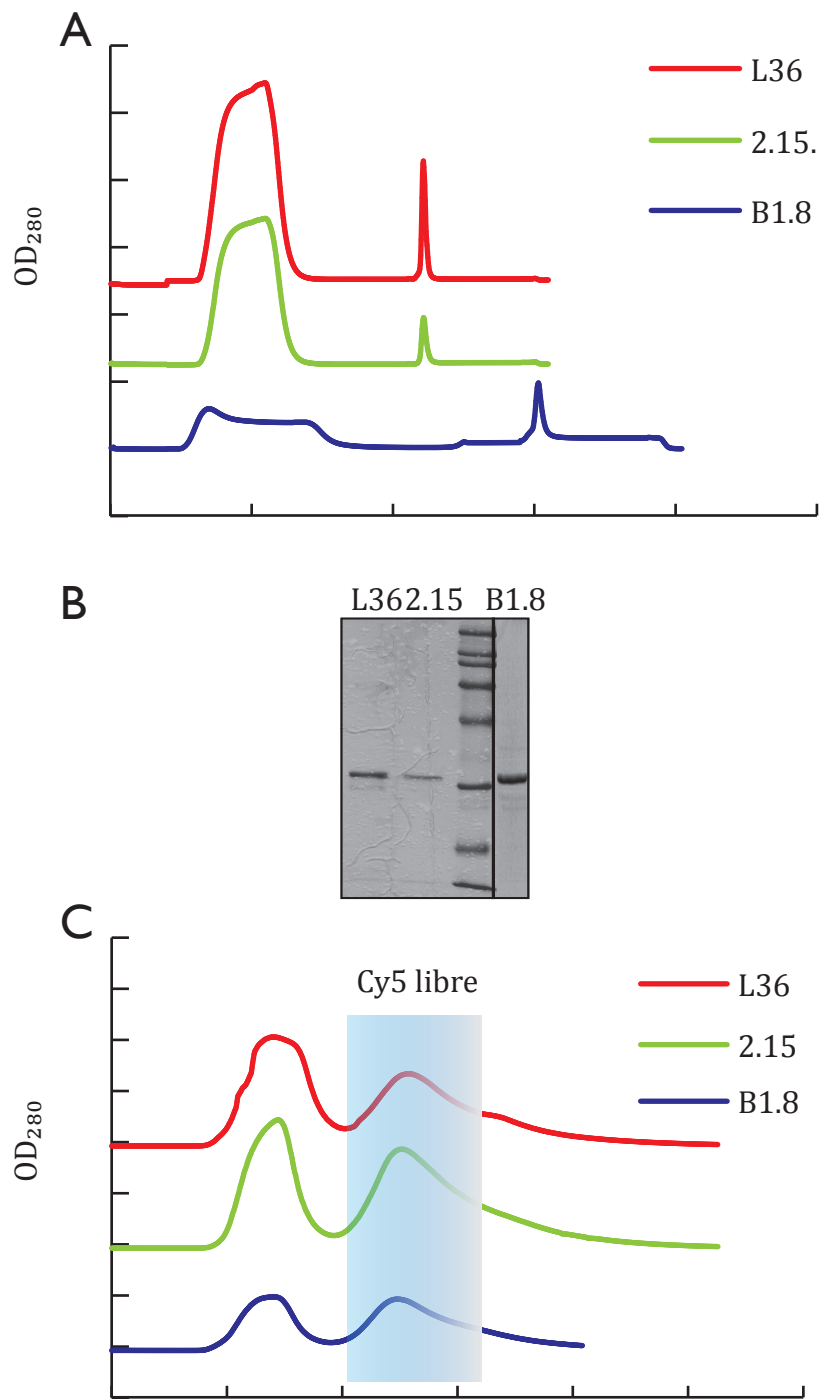


FIGURA 15. PURIFICACIÓN DE LOS scFv.

A) Cromatograma de purificación de los scFv solubles (2.15 y L36 purificados por afinidad empleando una columna de proteína A, y B1.8 empleando una columna IMAC). B) Material purificado analizado por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. C) Separación del anticuerpo conjugado a la cianina-5 de la cianina no conjugada.

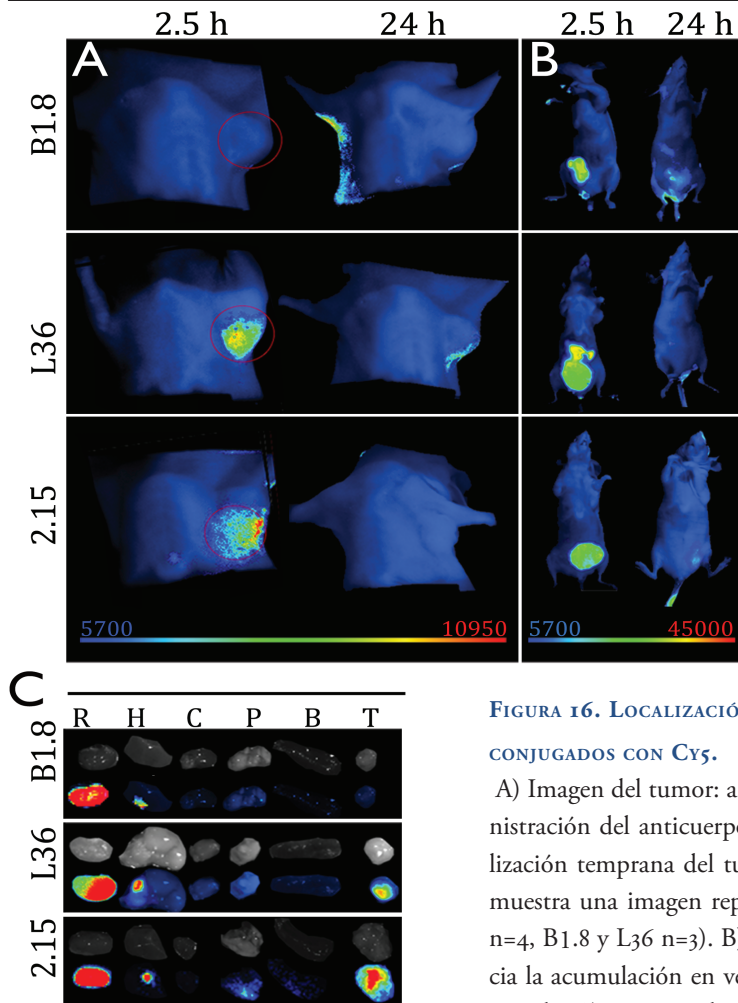


FIGURA 16. LOCALIZACIÓN *IN VIVO* DE ANTICUERPOS CONJUGADOS CON Cy5.

A) Imagen del tumor: a las 2,5 h y a las 24 h de la administración del anticuerpo soluble, se consigue una localización temprana del tumor con el anticuerpo 2.15 (se muestra una imagen representativa de cada grupo, 2.15 n=4, B1.8 y L36 n=3). B) Vista ventral en la que se aprecia la acumulación en vejiga a las 2,5 h y la eliminación a 24 h. C) Imagen obtenida de órganos extraídos a las 2,5 h de la administración del anticuerpo. Se aprecia una marcada acumulación renal en todos los *scFv* independientemente de su especificidad, y una clara acumulación tumoral para los anticuerpos 2.15 y L36 (R, riñón; H, hígado; C, corazón; P, pulmón; B, bazo; T, tumor).

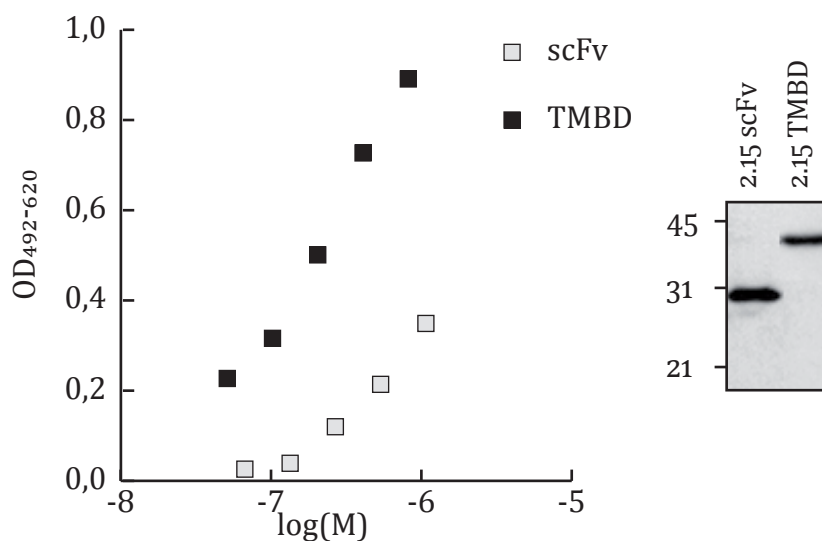


FIGURA 17. ESTUDIO FUNCIONAL COMPARATIVO ENTRE EL ANTICUERPO 2.15 EN FORMATO MONOMÉRICO Y TRIMÉRICO. (calculando la misma concentración molar de unidades de monómero). Detalle: *Western Blot* en el que se detecta el monómero empleando un anticuerpo anti-myc.

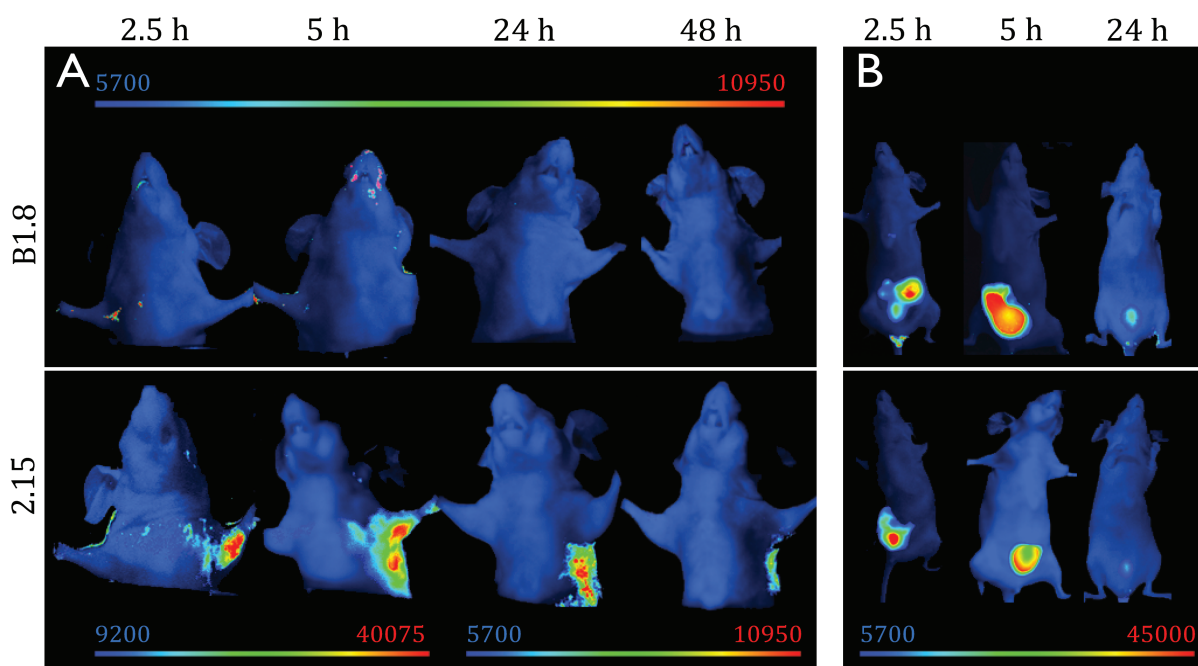


FIGURA 18. MEJORA EN LA LOCALIZACIÓN TUMORAL AL EMPLEAR EL FORMATO TRIMÉRICO.

A) El formato de *trimerbody* permite la localización del tumor durante más tiempo que el *scFv*: la mejor señal obtenida con el *scFv* es comparable a la obtenida a las 24 h con el trímero. B) La máxima acumulación en vejiga se obtiene a las 5 h.

células MDA-MB-231 (Figura 18). La señal se detectó durante al menos 48 horas, con un máximo de intensidad a las 5 horas de la inoculación. No se detectó emisión de señal en los ratones que recibieron un *trimerbody* control (B1.8) por vía intravenosa. Al comparar la localización tumoral del *scFv* 2.15 administrado por vía sistémica, con marcadores descritos en la literatura para el péptido LyP-1 (marcadores linfáticos, LYVE) no se evidenció colocalización (Figura 19). Se observan, en cambio, dos tipos de patrones: una tinción en grupos celulares relativamente aislados (posiblemente macrófagos) y una tinción localizada en la región extraluminal del endotelio vascular (CD31).

Estos resultados confirman la utilidad de p32 como diana en un modelo animal. Un anticuerpo —dirigido frente a la región amino terminal de la proteína p32— administrado sistémicamente es capaz de penetrar en el depósito tumoral e interactuar con diferentes componentes del mismo, aunque con un patrón distinto al documentado para el péptido LyP-1. Las diferencias observadas entre el anticuerpo y el péptido pueden tener su origen en el procesamiento del péptido tras la interacción con el receptor: LyP-1 contiene un motivo CendR [Teesalu *et al.* 2009] que media la internalización del péptido y permite la diseminación por el tejido en un proceso que es independiente de ligando [Ruoslahti *et al.* 2010]. Además, en la actualidad sabemos que

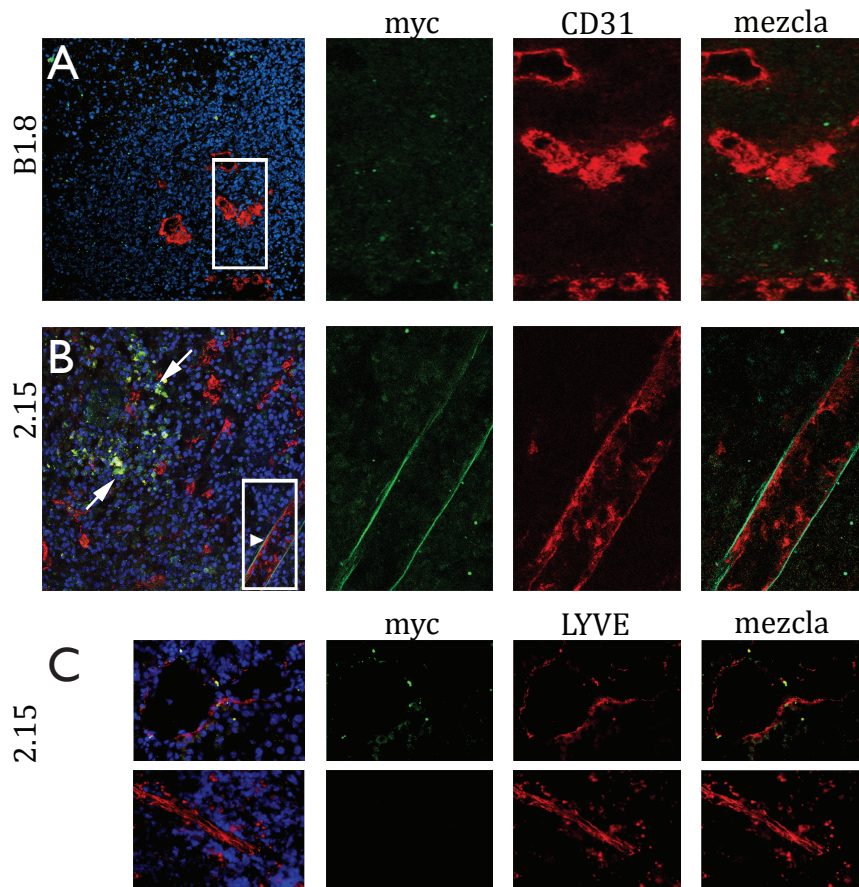


FIGURA 19. ESTUDIOS DE COLOCALIZACIÓN EN TUMORES.

El anticuerpo 2.15 se localiza fundamentalmente en agrupaciones celulares y en la región extraluminal del endotelio vascular. Sección de un tumor tras la administración intravenosa del anticuerpo de control B1.8 (A) o 2.15 (B). Una menor asociación se puede encontrar también en vasos linfáticos (C).

los epítomos frente a los que están dirigidos son ligeramente distintos. Trabajos previos [Fogal *et al.* 2008] mapearon la región de interacción entre el péptido y la proteína en la región amino terminal —en función de la capacidad de inhibición de anticuerpos monoclonales y policlonales disponibles y del efecto terapéutico en modelos animales conseguido al usar estos anticuerpos—. Sin embargo, para esos ensayos de inhibición no se empleó el péptido no conjugado, sino la partícula viral multivalente empleada en la selección. Al ser una partícula muy grande, masiva en comparación con el péptido, no es necesario que el péptido y el anticuerpo reconozcan exactamente el mismo epítipo, sino que es suficiente con que haya un impedimento estérico generado por la presencia del anticuerpo que dificulte el posicionamiento del fago en una posición compatible con la interacción. En la actualidad se considera que el epítipo del péptido

está localizado en el orificio central del toroide formado por el trímero de p32 (comunicación personal), mientras que el epítipo del anticuerpo 2.15 se localiza en la región amino terminal y se solapa con el epítipo del anticuerpo monoclonal 60.11.

En esta primera parte del trabajo se demuestra la utilidad de un anticuerpo anti-p32 para localizar depósitos tumorales *in vivo*. Estos resultados representan un nuevo concepto en el campo de la localización tumoral (*tumor targeting*). Hasta el momento, las estrategias de *tumor targeting* se han basado en anticuerpos dirigidos frente antígenos asociados a tumor, expresados en la superficie de la célula tumoral y frente a marcadores vasculares asociados al crecimiento tumoral. Además, se ha demostrado que el anticuerpo anti-p32 en formato trivalente (*trimerbody*) mejora su eficacia como elemento de localización tumoral. Como prueba de concepto se ha empleado la conjugación con un fluorocromo para determinar la capacidad de retención en el órgano diana; no obstante, esta molécula es susceptible de ser sustituida por otras de interés biomédico.

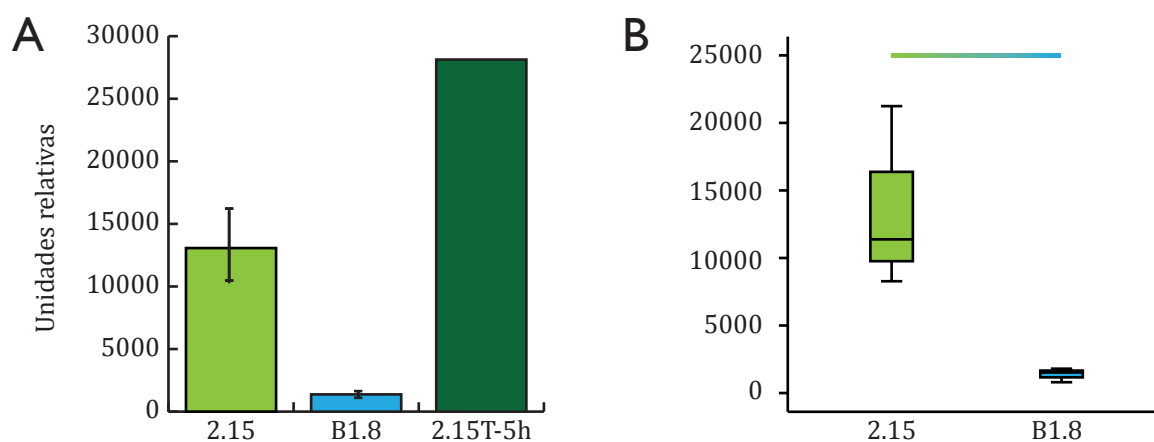


FIGURA 20. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA FLUORESCENCIA ACUMULADA EN EL TUMOR.

A) Se representa la media \pm Error típico de la media (2.15-*scFv* n=4; B1.8-*scFv* n=3; 2.15-*Trimerbody* n=2) de la región de interés correspondiente al tumor, B) Representación de diagrama de cajas de los mismos valores (la barra coloreada indica diferencias significativas entre los grupos; $p = 0,034$, U de Mann-Whitney).

IV.2. MODELOS ANIMALES

En esta segunda parte del trabajo se intenta aplicar la TPPF en dos modelos *in vivo* relacionados: uno que remeda la angiogénesis fisiológica humana (el componente endotelial es humano) y otro en el que se desarrolla una angiogénesis patológica murina en un contexto tumoral.

IV.2.1. MVH

IV.2.1.1. DETERMINACIÓN DEL PERÍODO VENTANA PARA REALIZAR LA SELECCIÓN

El seguimiento del establecimiento del implante vascular —así como la determinación del período idóneo para llevar a cabo la selección del repertorio de anticuerpos— se realiza evaluando la emisión de luminiscencia *in vivo*. Se ha determinado la ventana temporal en la que realizar la selección en torno al séptimo día tras la implantación del MVH. Al cuarto día, la emisión de bioluminiscencia es, aproximadamente, el 2,2% de la emisión observada el primer día (el máximo de emisión detectado). El séptimo día comienza un repunte (aproximadamente, el 145% de la emisión del cuarto día) en la emisión de bioluminiscencia como consecuencia del inicio de la reorganización de la vasculatura (Figura 21). El seguimiento de la emisión de bioluminiscencia permite no sólo la determinación del momento adecuado para realizar la selección, sino también detectar anomalías en la implantación del MVH que permiten excluir aquellos que no cumplen los criterios de selección.

IV.2.1.2. SELECCIÓN DEL REPERTORIO DE ANTICUERPOS GRIFFIN.1 SOBRE EL MVH

Una vez determinado el período idóneo para realizar la selección del repertorio de anticuerpos en el MVH, ésta se lleva a cabo en dos etapas: dos rondas de selección *ex vivo* seguidas de una ronda *in vivo* (Tabla 6).

Para la primera ronda de selección *ex vivo* se han empleado tres implantes MVH (implantados en dos ratones). Tras el procesamiento se obtienen $3,2 \times 10^4$ células (95% viables), resuspendidas en 330 µl de PBS. A este volumen se añade el repertorio Griffin.1 durante 90 minutos en agitación a temperatura ambiente.

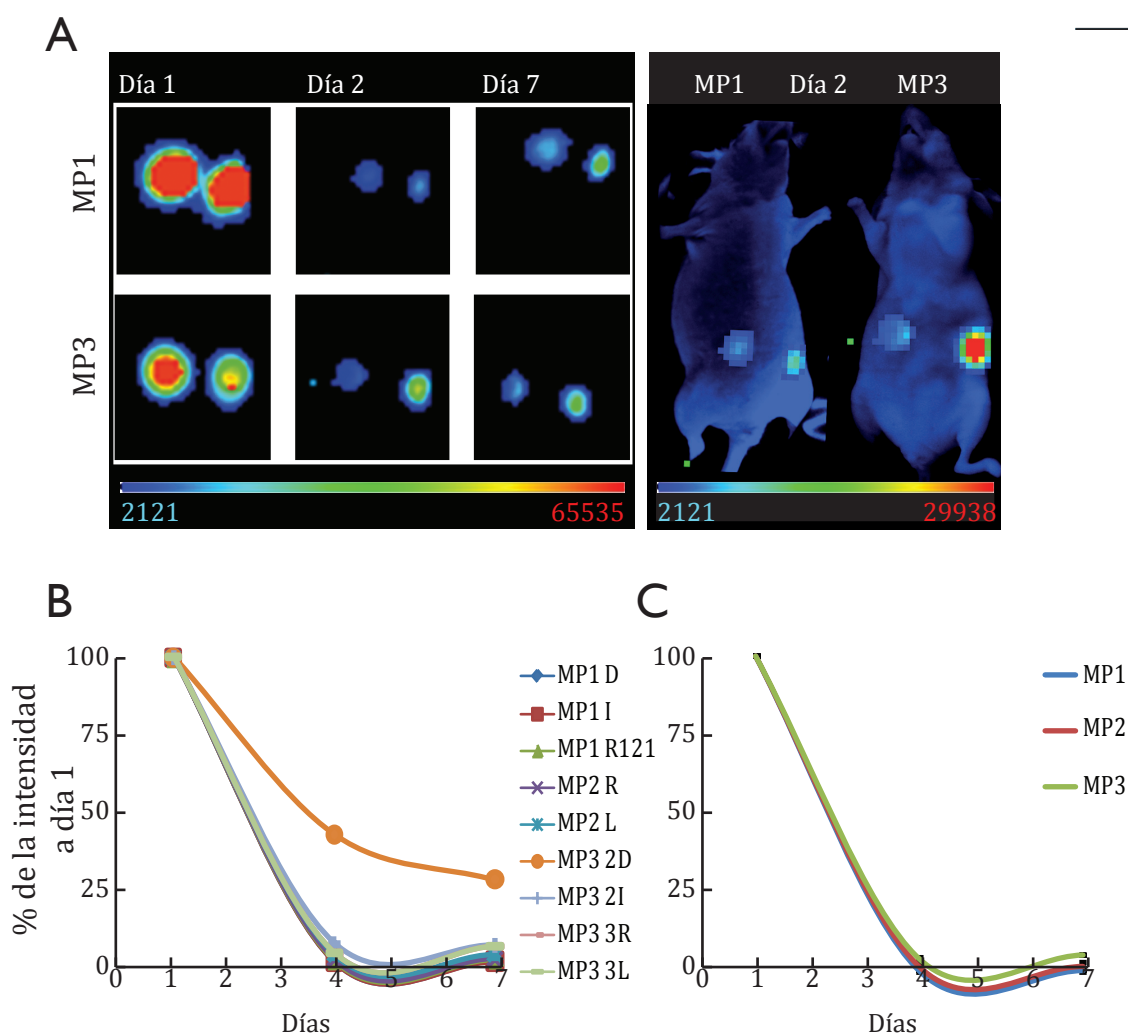


FIGURA 21. DETERMINACIÓN DEL PERÍODO VENTANA PARA LA REALIZACIÓN DE LA SELECCIÓN.

A) Seguimiento de la emisión de bioluminiscencia de dos MVH en dos ratones distintos desde el primer día tras la implantación hasta el séptimo día (izquierda); comparación de la emisión en el segundo día entre dos ratones distintos (derecha). B) Se aprecia que hay un marcado descenso desde la emisión del primer día hasta los valores mínimos registrados el cuarto día, y cómo posteriormente se recupera de manera progresiva. La cuantificación de la emisión permite monitorizar el proceso de implantación y detectar anomalías (como la observada en el implante identificado como MP3 2D) que motivan la exclusión del implante de la siguiente ronda de selección. C) Agrupados en las distintas selecciones (se representa el valor medio \pm Error típico de la media).

Como resultado de la primera ronda de selección se obtiene, en la fracción extracelular, un 60% de clones completos y un 40% de clones parciales; mientras que la fracción intracelular está compuesta por un 41% de clones completos y un 59% de clones parciales. Este enriquecimiento en clones parciales —compuestos únicamente por el dominio V_L — se incrementa drásticamente en la segunda ronda de selección *ex vivo*, y se mantiene después de la selección *in vivo* (Figura 22). En la Figura 23 se representan los tipos de cadenas pesadas y ligeras que se encuentran en el repertorio, junto con la frecuencia en la que aparecen. No hay grandes desviaciones respecto a

las frecuencias encontradas en el repertorio naif [Griffiths *et ál.* 1994] en cuanto a los subtipos de cadenas ligeras presentes, excepto en el reparto de IGLV1 (observado 26%, cuando se esperaba en torno al 11%), IGLV2 (observado 4%, esperado 12%). Aunque el porcentaje de clones completos —y, por tanto, la representación de cadenas pesadas es baja— el incremento observado en el subtipo IGHV1 (observado 57%, esperado 23%) contrasta con la disminución del subtipo IGHV3 (observado 15%, esperado 57%).

No parece haber un enriquecimiento entre la primera y segunda rondas de selección *ex vivo*. Asimismo, al realizar una ronda de selección *in vivo* con el repertorio procedente de esta segunda ronda se obtiene un repertorio constituido, casi en su totalidad, por anticuerpos parciales (Figura 22). La reducida relación entre el total de fagos obtenidos y el repertorio inoculado puede estar propiciada, al menos parcialmente, por el limitado volumen total disponible en la diana (el volumen máximo posible, equivalente al volumen total del implante, es de, aproximadamente, 0,02-0,1 cm³).

En este punto, habiendo establecido la ventana temporal durante la que llevar a cabo el proceso de selección, así como el procesado *ex vivo* de los implantes, se decidió interrumpir el enriquecimiento en este modelo hasta esclarecer los motivos conducentes a la desaparición de los clones completos. Para ello, se continúa con los modelos *in vivo* de selección en los modelos tumorales (que constituyen una diana más accesible y con más material para la interacción con las partículas virales).

TABLA 6. ENRIQUECIMIENTO OBTENIDO EN LAS RONDAS DE SELECCIÓN FRENTE AL MVH.

Ronda	Fracción	Output	Input	O/I
0.1.0	Extra	2×10^7	10^{13}	2×10^{-6}
0.1.0	Intra	5×10^5	10^{13}	5×10^{-8}
0.2.0	Extra	$9,9 \times 10^6$	10^{13}	$9,9 \times 10^{-7}$
0.2.0	Intra	$2,6 \times 10^4$	10^{13}	$2,6 \times 10^{-9}$
0.2.1	Extra	3×10^3	2×10^{11}	$1,5 \times 10^{-8}$

O/I: Relación entre la cantidad obtenida (*Output*) y la cantidad inicial (*Input*). Extra, fracción extracelular; Intra, fracción intracelular. (X.Y.Z): X, número de rondas *in vitro*; Y, número de rondas *ex vivo*; Z, número de rondas *in vivo*.

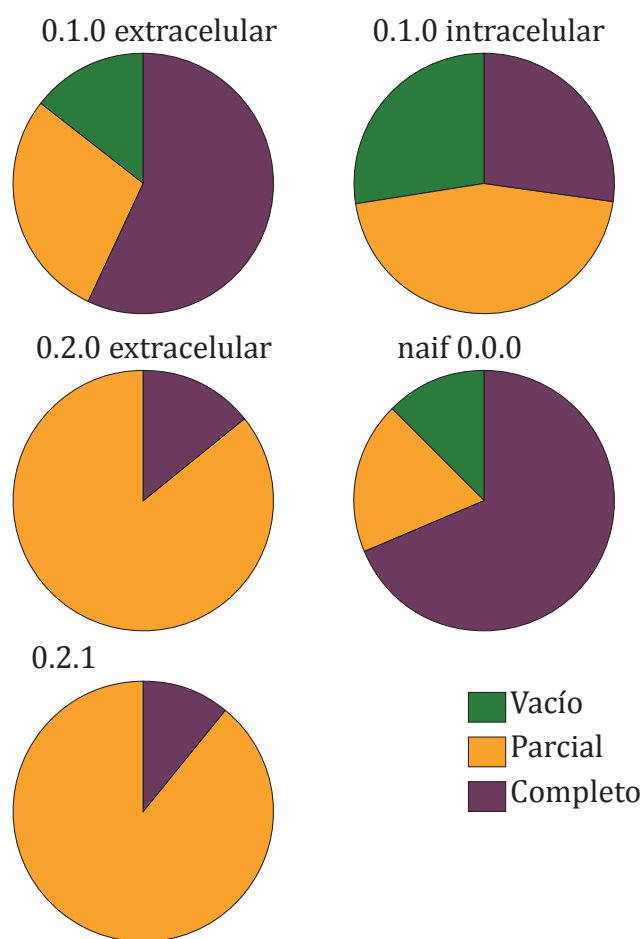


FIGURA 22. EVOLUCIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE CLONES COMPLETOS Y PARCIALES EN LAS DISTINTAS RONDAS DE SELECCIÓN.

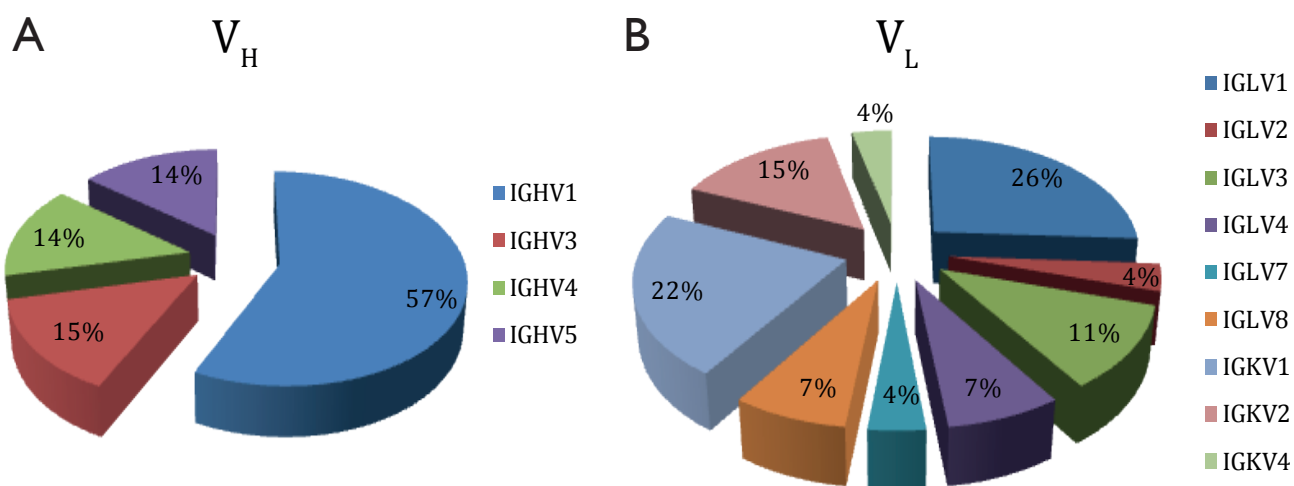


FIGURA 23. USO DE LOS DISTINTOS SEGMENTOS.

A) Se encuentran representados miembros de la familia IGHV1, 3, 4 y 5 (ausencia destacable de IGHV2).
B) Se encuentran representados miembros de diversas familias IGLV e IGKV (mayor abundancia de IGKV1, IGLV1, IGKV2 e IGLV3).

IV.2.2. MODELOS TUMORALES

IV.2.2.1. SELECCIÓN CON UN REPERTORIO DE *scFv*

El objetivo de esta selección ha sido la obtención de anticuerpos *scFv* específicos frente a dianas expresadas preferencialmente en el contexto tumoral (o, al menos, preferencialmente accesibles). Para ello, se han abordado dos modelos tumorales y varias alternativas en el proceso de selección.

Los modelos tumorales escogidos se corresponden también con dos modelos animales ligeramente distintos: la línea tumoral PPC-1, humana, derivado de un cáncer de próstata, requiere el uso de animales inmunodeficientes (*nude*). La línea tumoral 4T1 —derivada de un cáncer de mama—, en cambio, es de origen murino y puede implantarse en ratones inmunocompetentes (Balb/c).

Las variantes en el proceso de selección responden a lo expuesto en el apartado I.3.2: se empleó el repertorio Griffin.¹ para realizar un enriquecimiento *in vitro* y *ex vivo* previo a la selección *in vivo*.

Se realizó una ronda de selección *in vitro* empleando distintas cantidades de fago inicial (Tabla 7), frente a 10^6 células diana, y se comparó el rendimiento de una de estas primeras rondas de selección frente al repertorio naif en una ronda de selección *ex vivo* frente al órgano diana (tumor) y otros órganos de referencia; y en una ronda de selección *in vivo* (Figura 24). El título normalizado recuperado (respecto al promedio de los órganos) de la ronda *ex vivo* fue 3 veces superior al emplear la primera ronda de selección *in vitro* (1.0.0) respecto al obtenido con el repertorio naif. *In vivo*, en cambio, el incremento fue de tan sólo 1,8 veces.

Además de estudiar la cuantía del enriquecimiento, se hace necesario —especialmente a la vista de los resultados obtenidos con el modelo de vasculatura humana— analizar la composición de los repertorios enriquecidos en relación al porcentaje de clones del tamaño completo, de clones parciales, de clones que no se encuentran en marco de lectura entre el péptido líder y la proteína III del fago, etc. En la Figura 25 se pone de manifiesto el incremento de clones no codificantes obtenido, principalmente, de las rondas de selección *in vitro* y *ex vivo*.

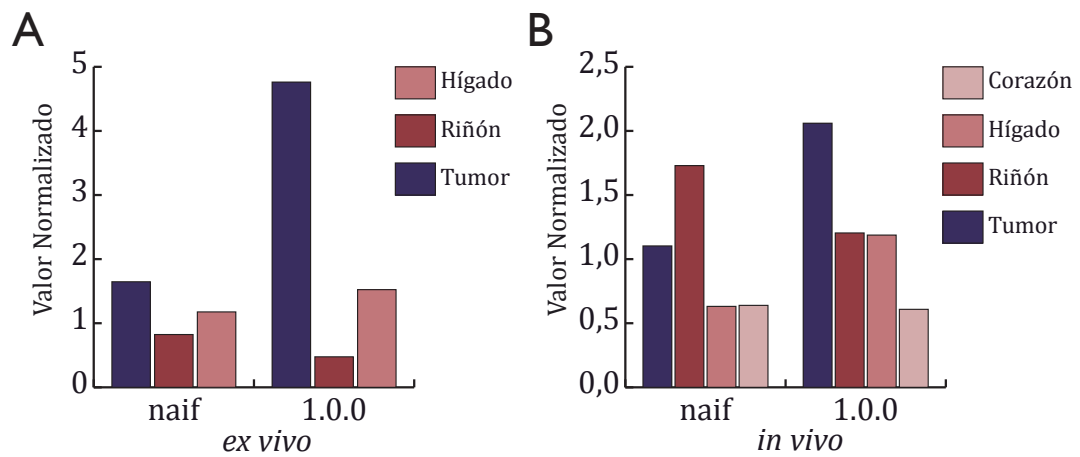


FIGURA 24. ENRIQUECIMIENTO DE LA PRIMERA RONDA DE SELECCIÓN.

Variación en el rendimiento en una ronda *ex vivo* (A) o en una ronda *in vivo* (B). Valores normalizados frente al promedio obtenido de los órganos.

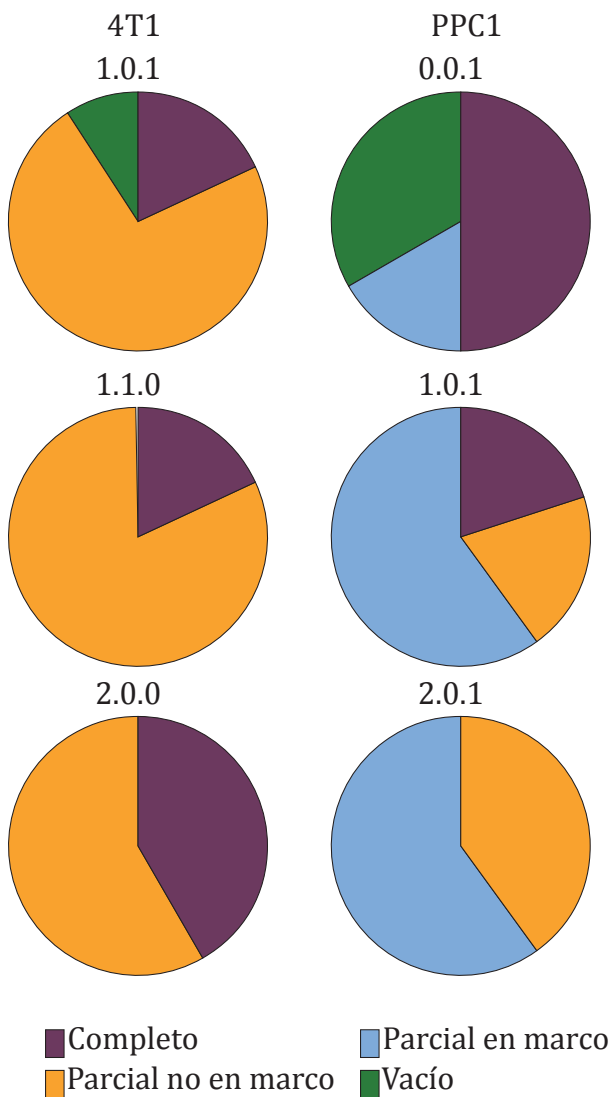


FIGURA 25. EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL REPERTORIO PRESELECCIONADO (4T1 Y PPC1).

Incremento progresivo de clones parciales en ambos repertorios. Se detecta un porcentaje creciente, especialmente procedente de la selección sobre 4T1, de clones en los que el péptido líder y la cadena ligera no están en el mismo marco de lectura (consecuencia de la construcción del repertorio).

Se puede obtener una evaluación indirecta del proceso de selección estudiando la evolución de la capacidad del repertorio seleccionado de reconocer células procedentes de cultivo (Figura 26). Si el enriquecimiento se ha realizado *in vitro*, cabría esperar un mayor porcentaje de células reconocidas por el repertorio (como se observa en el repertorio enriquecido durante dos rondas *in vitro* frente a PPC1). Si, en cambio, el enriquecimiento se ha realizado *ex vivo*, podría esperarse un incremento frente a todos los componentes presentes en el microambiente tumoral, incluyendo la célula cancerosa, pero no necesariamente frente a antígenos expresados por la célula tumoral en cultivo.

Para continuar con el proceso de selección, se escogieron los repertorios 4T1-1.1.0 y PPC1-2.0.0 como repertorios iniciales para la selección *in vivo*. La decisión se fundamentó, principalmente, en los resultados obtenidos del análisis por citometría de flujo. La ronda 1.1.0 correspondiente a la selección sobre células 4T1 reconoce un porcentaje de células mucho mayor que la ronda 2.0.0, que fue descartada por el paupérrimo enriquecimiento frente a las células diana (reconoce el mismo porcentaje que la ronda de selección que 1.0.1 —es decir, la ronda que se seleccionó en una ocasión con el cultivo celular y en una ocasión fue administrada *in vivo*— y un porcentaje mucho menor del obtenido en la misma ronda de selección frente a la línea PPC1). El tiempo de circulación se mantuvo en 15 minutos, apropiado para la selección de marcadores endoteliales [Zou *et al.* 2004].

Se obtuvo un progresivo enriquecimiento frente al tumor 4T1 en las selecciones *in vivo*, mientras que frente al tumor PPC1 el enriquecimiento fue exponencial (Figura 27). A partir de las últimas rondas de selección para cada modelo, se seleccionaron 13 candidatos y un control (pEMP, fago vacío que posee en marco de lectura el péptido líder junto con la proteína III del fago) para diseñar los ensayos de competición conforme a los parámetros 1-4 y 7 descritos en el apartado III.5.2.2.3.1 (Tabla 8).

IV.2.2.1.1. Ensayos de competición

Aparentemente, los repertorios de clones empleados para la competición se acumulan en ambos tipos de tumores (Figura 28a). Al analizar el comportamiento individual de los clones, parece que ninguno de los que proceden de la selección frente a 4T1 (identificados en la gráfica por un número) es capaz de incrementar el porcentaje recuperado del tumor respecto del porcentaje inoculado. En cambio, la mayoría de los clones procedentes de la selección frente a PPC1 (identificados en la gráfica por un

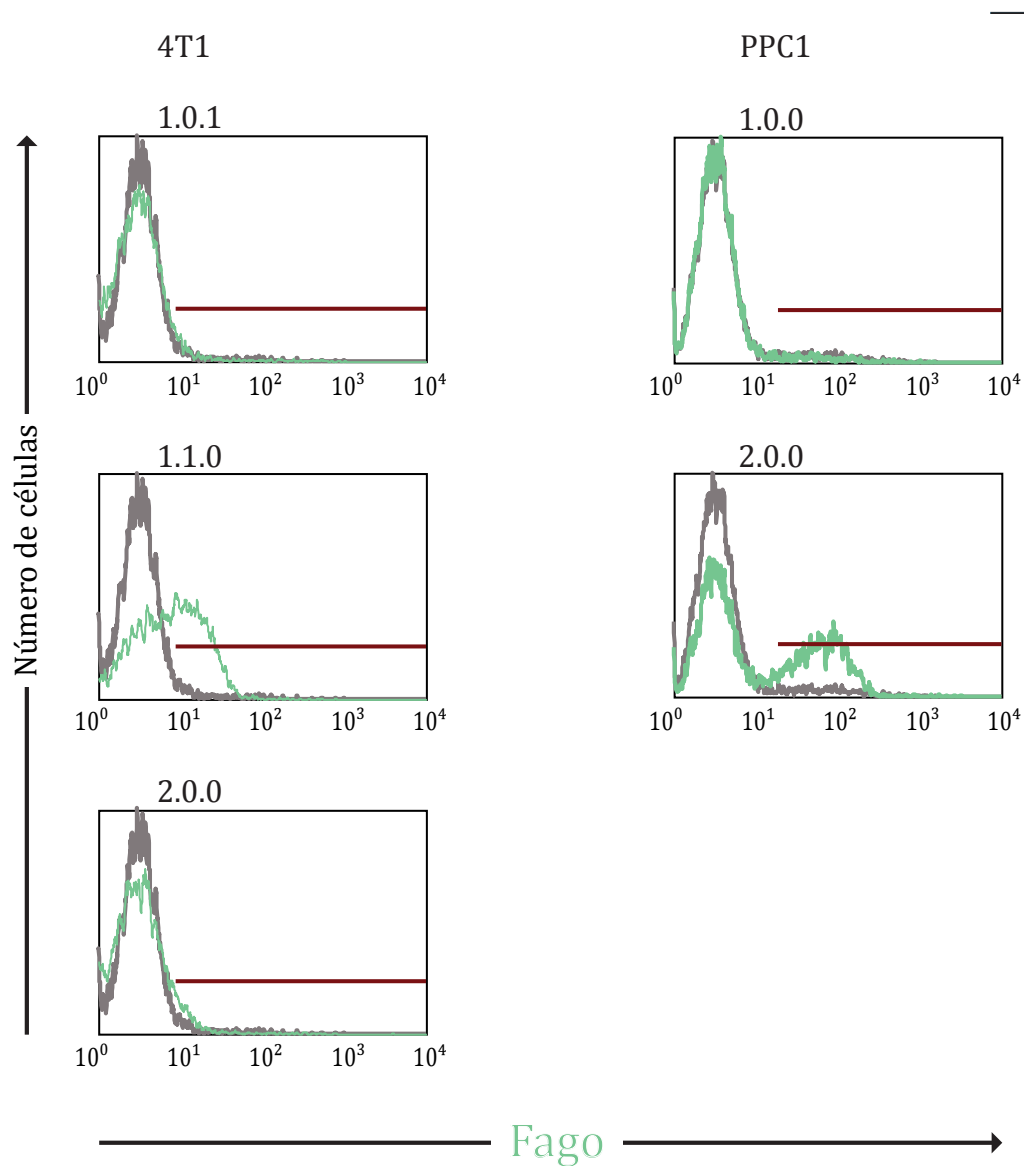


FIGURA 26. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS REPERTORIOS ENRIQUECIDOS CON LÍNEAS CELULARES.

TABLA 7. ENRIQUECIMIENTO DE LA PRIMERA RONDA DE SELECCIÓN EN FUNCIÓN DE LA CANTIDAD INICIAL.

Ronda	Diana	Output	Input	O/I
1.0.0	PPC1	$2,0 \times 10^4$	10^{11}	$2,0 \times 10^{-7}$
1.0.0	PPC1	$1,2 \times 10^5$	10^{12}	$1,2 \times 10^{-7}$
1.0.0	4T1	$3,0 \times 10^4$	10^{11}	$3,0 \times 10^{-7}$
1.0.0	4T1	$3,2 \times 10^4$	10^{12}	$3,2 \times 10^{-8}$
1.0.0	4T1	$2,0 \times 10^5$	10^{13}	$2,0 \times 10^{-8}$

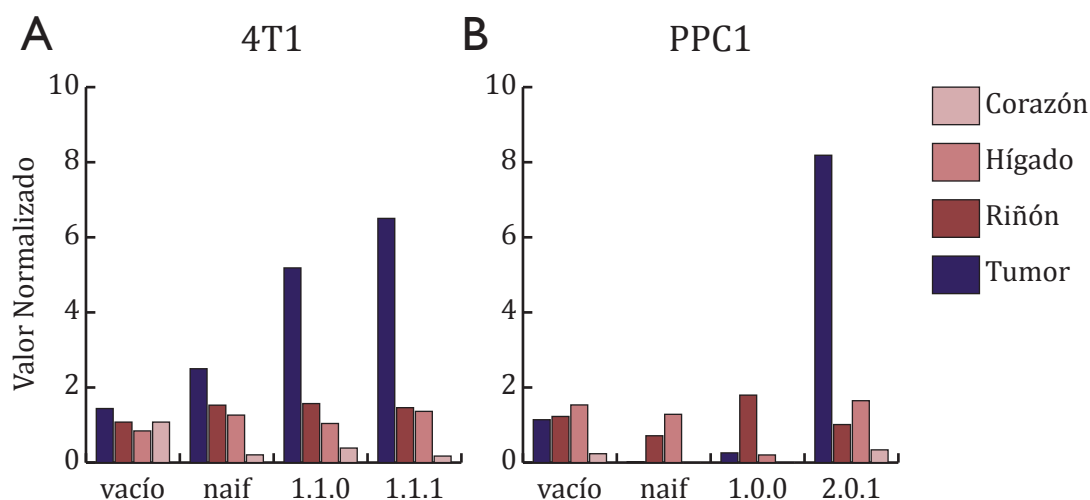


FIGURA 27. EVOLUCIÓN DE LAS SELECCIONES *IN VIVO*.

A) Enriquecimiento progresivo observado en la selección frente al tumor 4T1. B) Evolución de la selección frente al tumor PPC1.

TABLA 8. SECUENCIAS SELECCIONADAS PARA LOS ENSAYOS DE COMPETICIÓN (*scFv*).

Clon	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
2	SYTFTFHY	VPEDGET	ARVPAQP	SSDVGDYDH	NVN	SLYSSYSV
4				SLRSYY	GKN	NSRDSSGNHLV
5				SGYSNYK	VGTGGIVG	GADHGSGSNFHV
10				SGYSNYK	VGTGGIVG	GADHGSGSNFSV
12				TGAVTSGYY	STS	LLYYGGASFRV
15	GFTFSNAW	IKSKTDGGTT	ARDLQRVQG	SSNIGNNA	YDD	AAWDDSLV
P15	GFAFSSYV	IGTGGDT	ARCTNSP	SSNIGNNA	YDD	AAWDDSLCV
P19				*SLLHSDGYTY	EVS	MQDAQDLT
P20209				QSLHSDGYTY	EVS	MQDAQDRPT
P27				NTYCLRQPLDC	TLS	MQRIEFPNT
P29				RSLHSDGYTY	EVS	MQDAQDPT
P4				QSLHSDGYTY	EVS	MQDAQDRT
P6				QGISNY	AAS	LQDYNYPAT
pEMP				Vacío		

La mayoría de las secuencias seleccionadas frente al tumor 4T1 poseen dominios IGLV9, mientras que frente a PPC1 se obtiene un alto porcentaje de IGKV3.

número precedido de **P**) como mínimo duplican la presencia en el tumor respecto al porcentaje inicial y dos de ellos, P6 y P29, se ven incrementados en más de 10 y 6 veces respectivamente. Destacan las sorprendentes diferencias observadas entre distintos clones, como P29 y P20209, dos clones que se diferencian únicamente en la presencia o ausencia de un residuo de arginina en el CDR1 y CDR3 y que se comportan de manera completamente distinta en los dos tipos tumorales.

Es llamativo que ninguno de los clones completos (2, 15 y P15) presenta un comportamiento sobresaliente. Y sorprende, también, la semejanza entre el clon 15, seleccionado frente a 4T1, y el clon P15, seleccionado frente a PPC1. Ambos son clones completos y comparten casi totalmente la cadena ligera (se corresponde, en realidad, con el segmento DPL-3 perteneciente a la familia IGKV1, uno de los más ampliamente representados en el repertorio).

IV.2.2.1.2. Ensayos de localización

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de competición, parece que la selección frente a PPC1 fue más efectiva para seleccionar clones con capacidad de localización tumoral. No obstante, los clones seleccionados se acumulan en el tumor independientemente de la línea celular que lo haya generado (Figura 28b), por lo que se escogieron 4 clones procedentes de esta selección —P6, P27, P29 y P20209— para estudiar la capacidad de localización de los tumores PPC1. La inclusión de P20209 obedece al interés suscitado por la semejanza con P29 en la secuencia peptídica, y la diferencia observada en el ensayo de competición.

El patrón de distribución observado en los clones seleccionados corrobora los datos previos de los ensayos de competición (Figura 29). El clon P20209 se distribuye de manera similar al fago vacío, mientras que los clones P6 y P29 se acumulan preferencialmente en el tumor. Sin embargo, a pesar de estos resultados prometedores, estos clones comparten una característica que disminuye el interés generado. Ambos clones están formados únicamente por la V_L (Figura 30) por lo que la interacción con el posible ligando será, probablemente, más débil y al producirse en forma soluble, las regiones hidrofóbicas que generalmente median la formación del heterodímero V_H - V_L quedarán expuestas al solvente. De hecho, tras la inducción con IPTG de cultivos de *E. coli* HB2151 no se detecta la presencia de la etiqueta peptídica por *Western Blot* en el sobrenadante, ni en la fracción periplásmica ni en el pellet. En ocasiones, la proteína

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

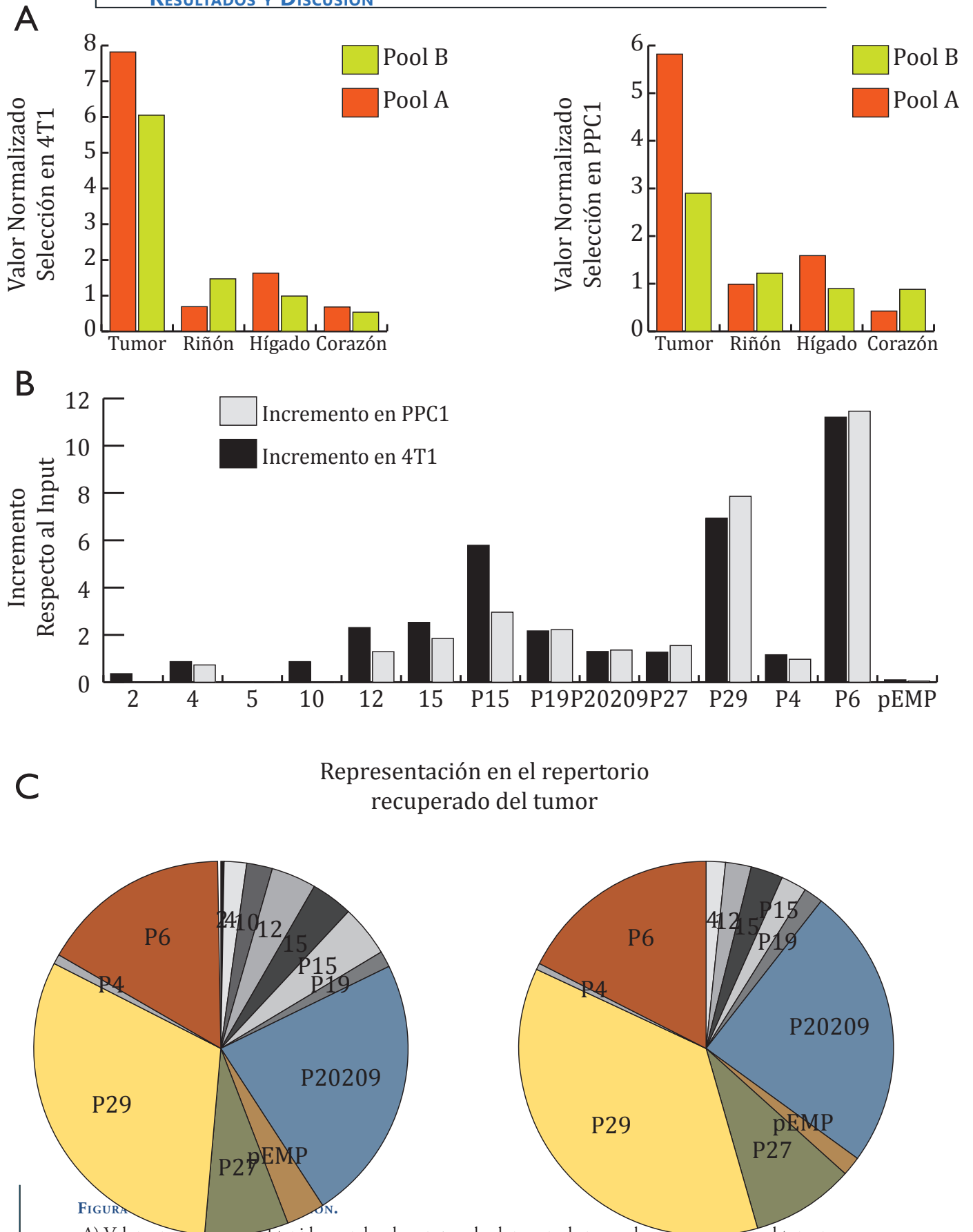


FIGURA 3. RESULTADOS DEL ENSAYO DE COMPETICIÓN.

A) Valores normalizados obtenidos con los dos grupos de clones en el ensayo de competición en el tumor 4T1 (izquierda) o PPC1 (derecha). B) Número de veces que se incrementa el porcentaje recuperado del tumor respecto al porcentaje en el repertorio inoculado. C) Representación esquemática de la contribución de cada uno de los clones al porcentaje total recuperado del tumor.

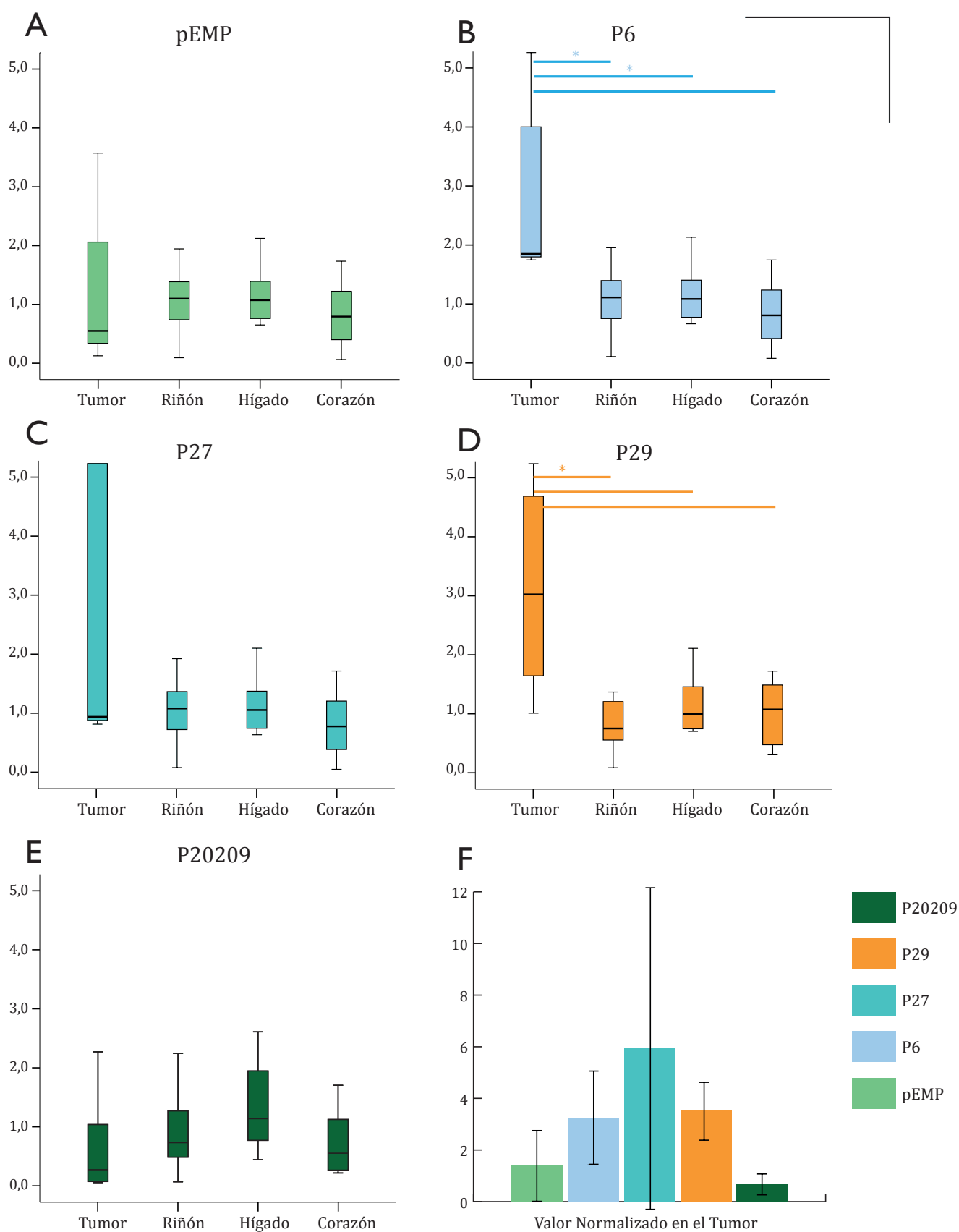


FIGURA 29. ENSAYO DE LOCALIZACIÓN TUMORAL.

A-E) Resumen de los ensayos de localización *in vivo* al administrar por vía sistémica preparaciones de fago monoclonal. P29 y P20209, N=6; pEMP, P6, P27, N =3. Las barras horizontales representan diferencias significativas ($p < 0,05$; *, $p < 0,01$) según U de Mann-Whitney. F) Media \pm Error típico de la media.

```

p6      MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMSAVSGDRVITTCRARQGISNYLAWFQQKPGKVPKHLIYA 60
P29     MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMSC---RSSRSLHSDGYT-YLYWFLQKARPVSTLLICE 55
        *****. * : : : * : * * * * . * . * *

p6      ASLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNYPATFGQGTKLEIKRA 120
P29     VSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDFGVYYCMQDAQDP--TFGQGTKLEIKRA 113
        . * . * * * . * * * * * : * * * . * * * * * : * * * * *

p6      AAHHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAA 145
P29     AAHHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAA 138
        *****
        pelB CDR1
        CDR2 CDR3
        6xHIS myc

```

FIGURA 30. COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS P6 Y P29.

Las diferencias en los aminoácidos presentes entre el péptido líder y el inicio de la cadena ligera son debidas a distintas PCR durante la construcción y clonaje del repertorio.

III del fago actúa como chaperona molecular, facilitando el plegamiento y confiriendo estabilidad a las proteínas que se expresan fusionadas. Esto explicaría, por ejemplo, la incorporación del dominio V_L al formato de fago en una cepa supresora de codones ámbar junto con la imposibilidad de identificar la proteína soluble en una cepa no supresora.

Es difícil justificar el motivo del enriquecimiento en clones parciales en estos modelos de selección. Una hipótesis puede ser que el espaciador que separa los dominios V_H y V_L —o una región adyacente (como el CDR3 presente en la V_H)— sea susceptible de ser sustrato de proteasas (presentes en el suero o en la superficie de la célula tumoral). De ser así, aquellos clones que interaccionen con el antígeno implicando al dominio V_H serán proteolizados en la región espaciadora y se producirá una separación física entre el dominio V_H y el fago de modo que, incluso si el V_H permanece unido al antígeno, el fago será eliminado en los lavados posteriores (Figura 31). El proceso sería el equivalente a una selección negativa. Esta hipótesis es atractiva, pero la composición del espaciador sigue el módulo estándar de G_4S considerado como un espaciador no hidrolizable, que está presente no sólo en el repertorio Griffin.¹, sino en multitud de anticuerpos recombinantes publicados [Chester *et al.* 1994].

El hecho de que los clones seleccionados se acumulen en el tumor, independientemente de la línea que lo haya generado (Figura 28) sugiere que pueden estar dirigidos frente a algún componente común a ambos tipos tumorales que, debido al tiempo de circulación permitido, probablemente sea algún marcador endotelial [Molek *et al.*

2011]. Aunque sería posible rescatar los clones seleccionados e intentar reformatearlos (por ejemplo, en un formato multivalente como el *trimerbody* empleado anteriormente), el proceso podría ser largo y costoso (especialmente para eliminar las regiones hidrofóbicas expuestas) y no garantizaría la consecución de moléculas con capacidad de localización tumoral. Por ello, se desarrolla una alternativa de selección que elimine el riesgo potencial de hidrólisis del anticuerpo recombinante durante la interacción basada en el uso de un repertorio formado por monodominios V_H , el repertorio DAb.

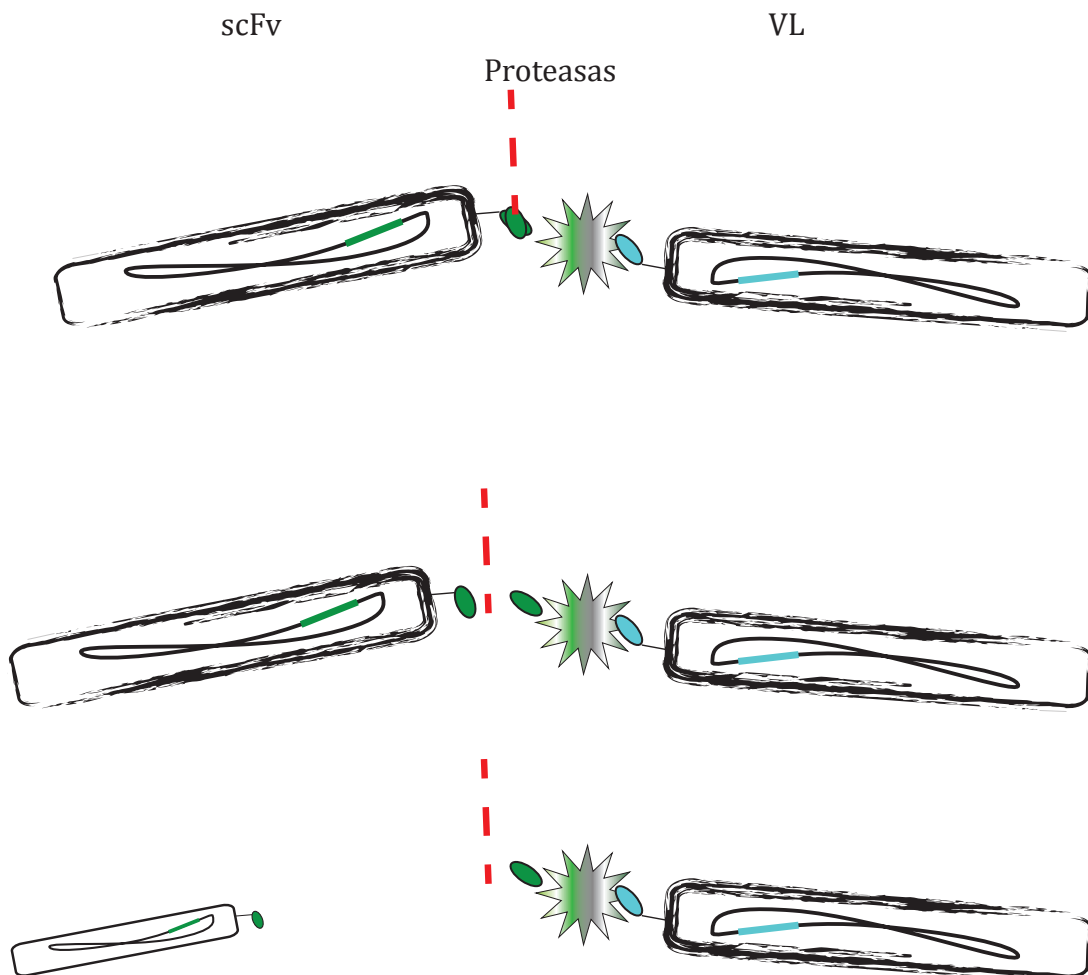


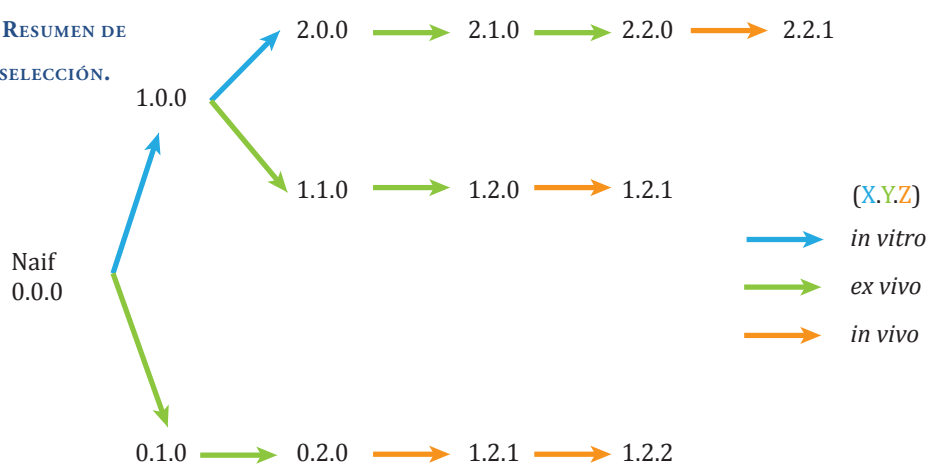
FIGURA 31. DIGESTIÓN DEL ESPACIADOR O DE REGIONES ADYACENTES.

La existencia de proteasas que degraden el espaciador entre el V_H y el V_L , o regiones adyacentes, podría explicar el incremento de clones carentes del V_H . Los clones completos serían eliminados en los lavados, mientras que los clones V_L podrían mantenerse unidos al tejido diana.

IV.2.2.2. FORMATO MONODOMINIO (DAB)

Se realizaron dos rondas de selección *in vitro* (empleando el repertorio DAB) frente a células tumorales procedentes de cultivos frescos con un enriquecimiento de la segunda ronda de ~ 220 veces la primera —relación O/I: 10^{-10} (primera ronda) y $2,22^{-8}$ (segunda ronda)— y una diversidad máxima de 500 clones. Ambos repertorios enriquecidos, junto con el naif, se emplearon para estudiar la influencia del número de rondas de selección *in vitro* en la recuperación de fagos tras una o dos rondas de selección *ex vivo* (la Figura 32 muestra un diagrama de las rondas de selección). Se comprobó que un mayor número de rondas conlleva un mayor porcentaje de fagos recuperados — y del tamaño teórico (Figura 33)—. Al emplear para la primera ronda de selección *in vitro* repertorios procedentes de la segunda ronda de selección *ex vivo* — algunas de las cuales, a su vez, procedían de rondas de selección *in vitro*—, se obtiene una acumulación en el tumor (representado, en la Figura 33, como el valor normalizado respecto al promedio de órganos —riñón, hígado, corazón— para reducir las diferencias entre los distintos ratones) para el repertorio que había sido preseleccionado con dos rondas *in vitro* y dos rondas adicionales *ex vivo*. Este incremento en la acumulación va acompañado de una disminución en la diversidad: el repertorio que no ha sido enfrentado *in vitro* a las células tumorales y que se ha enfrentado en dos rondas de selección al extracto tumoral *ex vivo* presenta una mayor diversidad (el 100% de los 31 clones secuenciados son distintos) que el que había sido previamente preseleccionado una vez *in vitro* (53% de secuencias únicas) o el que había sido preseleccionado en dos ocasiones (38% de secuencias únicas y una secuencia predominante), como se recoge

FIGURA 32. RESUMEN DE RONDAS DE SELECCIÓN.



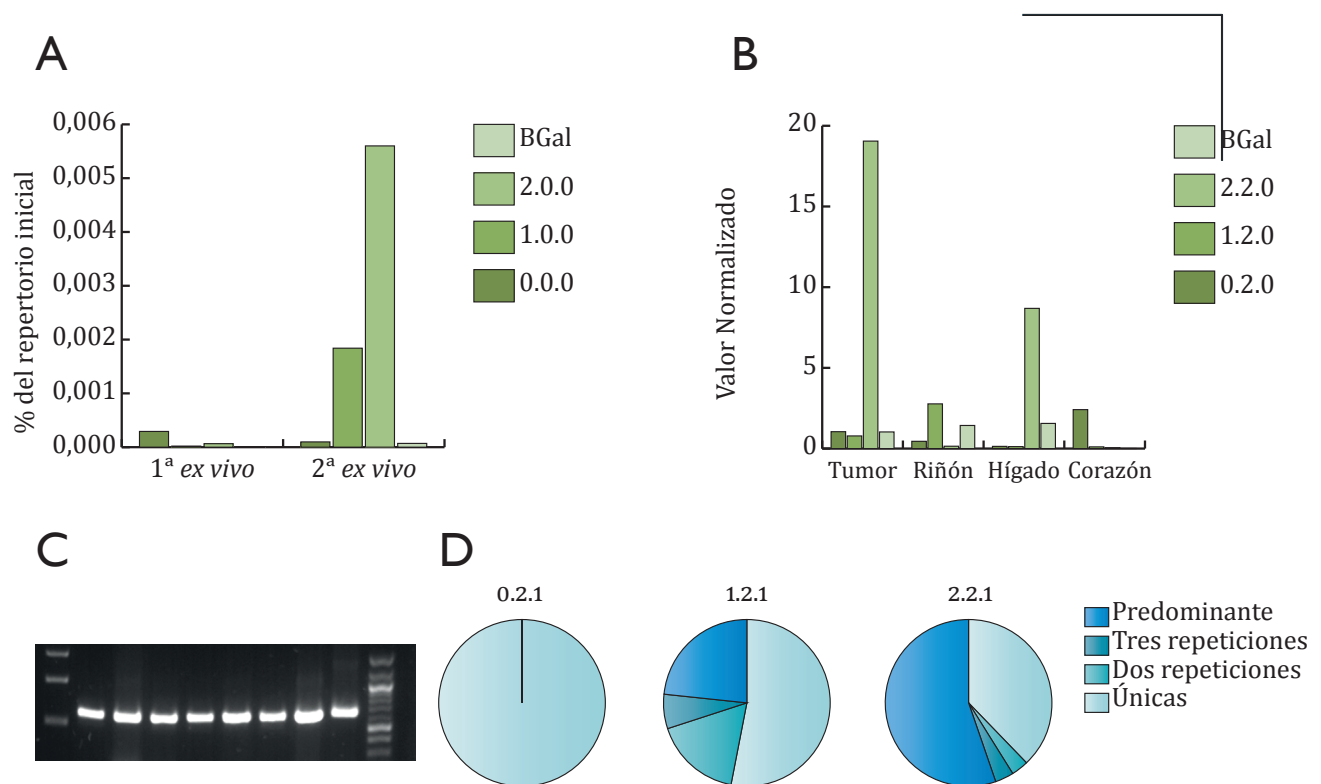


FIGURA 33. EVOLUCIÓN DE LAS SELECCIONES CON EL REPERTORIO DAB.

A) Influencia del número de rondas *in vitro* en la selección *ex vivo*; B) Resultados tras la primera ronda de selección *in vivo* con diferentes repertorios iniciales y un tiempo de circulación de 24 h; C) Todos los clones recuperados tienen el tamaño teórico completo (muestra de una PCR de 8 clones aleatorios de la segunda ronda de selección *ex vivo*, comprobado por secuenciación); D) Evolución de la diversidad del repertorio: influencia del enriquecimiento *in vitro* y del número total de rondas.

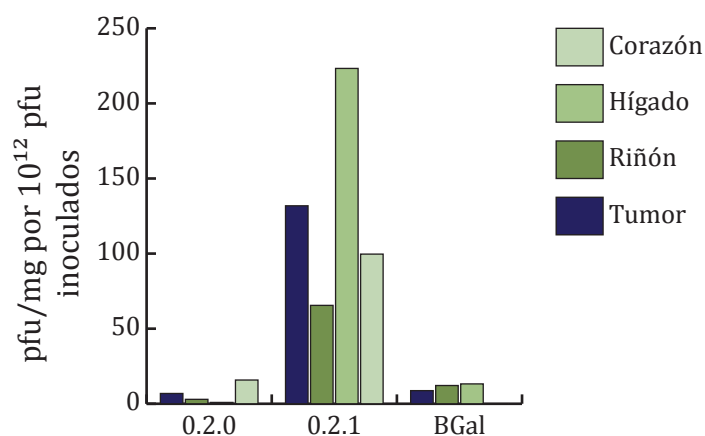


FIGURA 34. INFLUENCIA DEL AUMENTO DE NÚMERO DE Rondas de selección *in vivo* en la recuperación de partículas.

El aumento de rondas de selección permite recuperar un porcentaje mayor de la dosis inoculada, pero no sólo en el órgano diana sino en todos los órganos estudiados.

en la Figura 33d. Una ronda adicional *in vivo* permite incrementar el total de partículas virales recuperado, pero no parece mejorar la localización específica en el tumor (Figura 34).

IV.2.2.2.1. Ensayos de competición

Se seleccionaron diez clones (Tabla 9) —siguiendo los parámetros 1-4 descritos en el apartado III.5.2.2.3.1— procedentes de las distintas rondas para realizar un ensayo de competición en condiciones similares a la selección *in vivo*, pero con una mezcla conocida de fagos monoclonales. Se dividieron en dos grupos (M y N), en cantidades equivalentes, se inocularon en ratones portadores de tumor y se permitió que circularan durante quince minutos, transcurridos los cuales se recuperaron siguiendo el protocolo estándar tanto del tumor como de los órganos seleccionados (Figura 35a). Así, se pudo estudiar de manera separada la composición de los repertorios obtenidos de cada uno de los órganos para identificar aquellas secuencias representadas de manera diferente en el repertorio original, en el tumor y en el conjunto de órganos (Figura 35b). Se comprobó que, si bien el comportamiento de los distintos clones era diferente, no aparecía ninguna secuencia predominante en el tumor que no estuviera también ampliamente representada en el conjunto de órganos.

Es destacable el comportamiento del clon identificado como D10 que es la secuencia predominante (>55%) tras la primera ronda de selección *in vivo* del repertorio preseleccionado dos veces *in vitro* y dos veces *ex vivo*. En este caso, no parece mostrar predilección por el tumor, dado que se encuentra incluso más representado en el conjunto de órganos del animal. Este comportamiento es inesperado, precisamente, por la selección previa *in vitro* frente al tumor: procede de selecciones frente a células tumorales, en ausencia de cualquier otro tipo celular. Más aún, al realizar un experimento de unión a células procedentes de un cultivo *in vitro* con preparaciones monoclonales de aquellos fagos que mostraron una cierta preferencia por el componente tumoral, este clon (D10) es capaz de unirse de manera eficiente (más de 10 veces el valor del negativo) a las células presentadas (Figura 35c).

A raíz de estos resultados, se reconsideró el parámetro del tiempo de circulación y su relación con la vida media de un fago filamentoso en la sangre ya que puede ser un factor que determine la diferencia entre el fondo y el órgano de interés. El tiempo de circulación de 15 minutos se considera suficiente para la identificación de dianas

TABLA 9. RESUMEN DE LAS SECUENCIAS SELECCIONADAS PARA LOS ENSAYOS DE COMPETICIÓN.

Nombre	Clon	CDR1	CDR2	CDR3	Codón Stop
Do1	o22g2	GVMITHHD	ISAPSGST	ATIDWGASAVPF	ámbar en FR1
Do2	o22f12	GDTFSYDY	IGNTGGST	ARSGHPSNWANSMSF	--
Do3	o22d7	GVRLNDDN	IRNHDGST	ARSGSVQ*TLRF	ámbar
Do4	o22h12	GDMLIAEA	IGTENGST	AGTRAGNDEVES	ámbar en FR1
Do5	o22a11	GDTVTAKD	I*ITNGST	ATTSGGNEDPLES	ámbar
Do6	o22e5	GYKISD*D	IRTPDGST	ATRYESGAVKEPINF	ámbar
Do7	222f9	GDSISYEA	I*EQNGST	ARDYGSRVQDQHLES	ámbar
Do8	o22b12	GYMVSSQA	IADGGGST	ATRTRDAAAKHNLKY	--
Do9	o22e7	GVSVSA*V	ILTNGST	ATDEQMHVQETPVEF	ámbar
D1o	o114d6	GFSFNSEY	IRKNGGST	AGTNAPSTQMKS	(secuencia predominante)

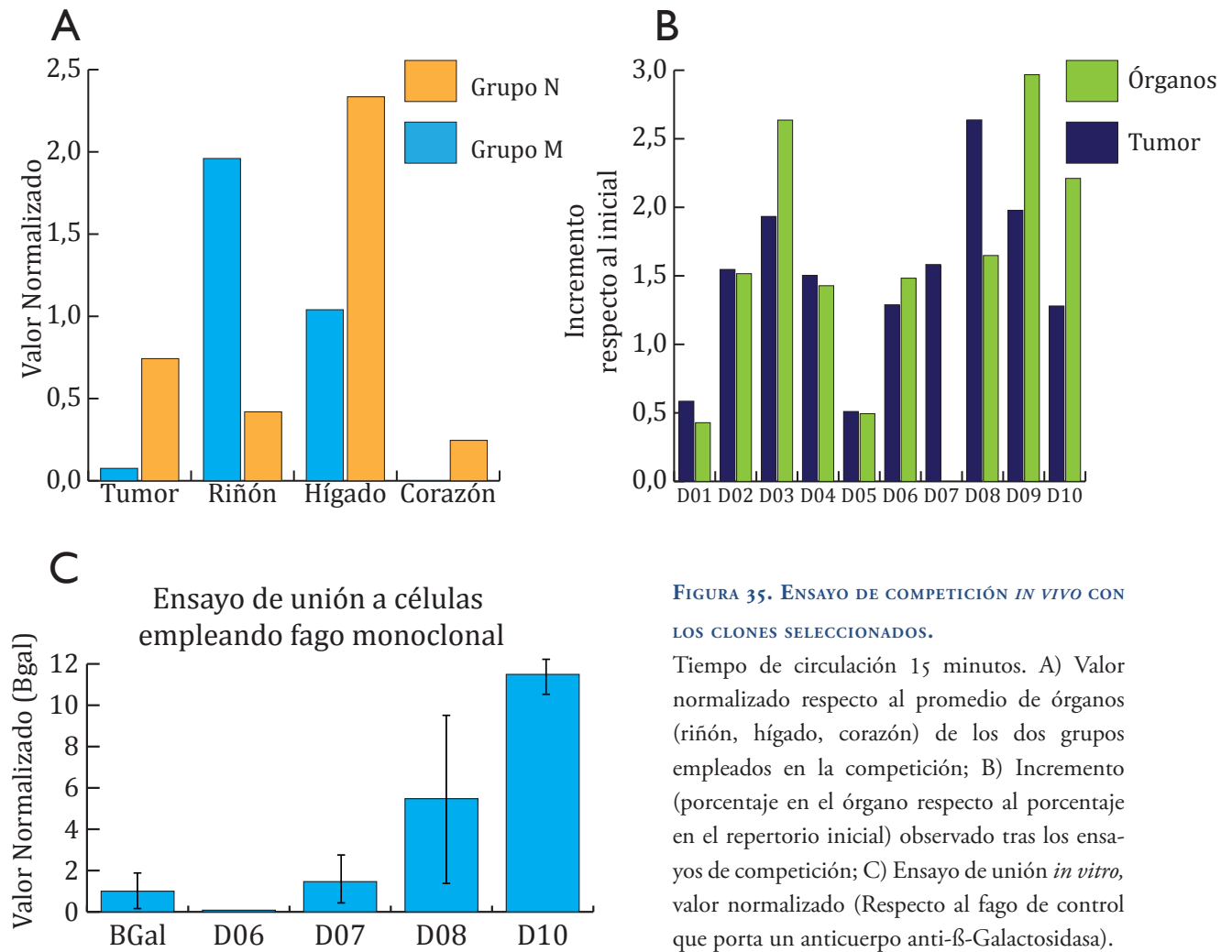


FIGURA 35. ENSAYO DE COMPETICIÓN *IN VIVO* CON LOS CLONES SELECCIONADOS.

Tiempo de circulación 15 minutos. A) Valor normalizado respecto al promedio de órganos (riñón, hígado, corazón) de los dos grupos empleados en la competición; B) Incremento (porcentaje en el órgano respecto al porcentaje en el repertorio inicial) observado tras los ensayos de competición; C) Ensayo de unión *in vitro*, valor normalizado (Respecto al fago de control que porta un anticuerpo anti-β-Galactosidasa).

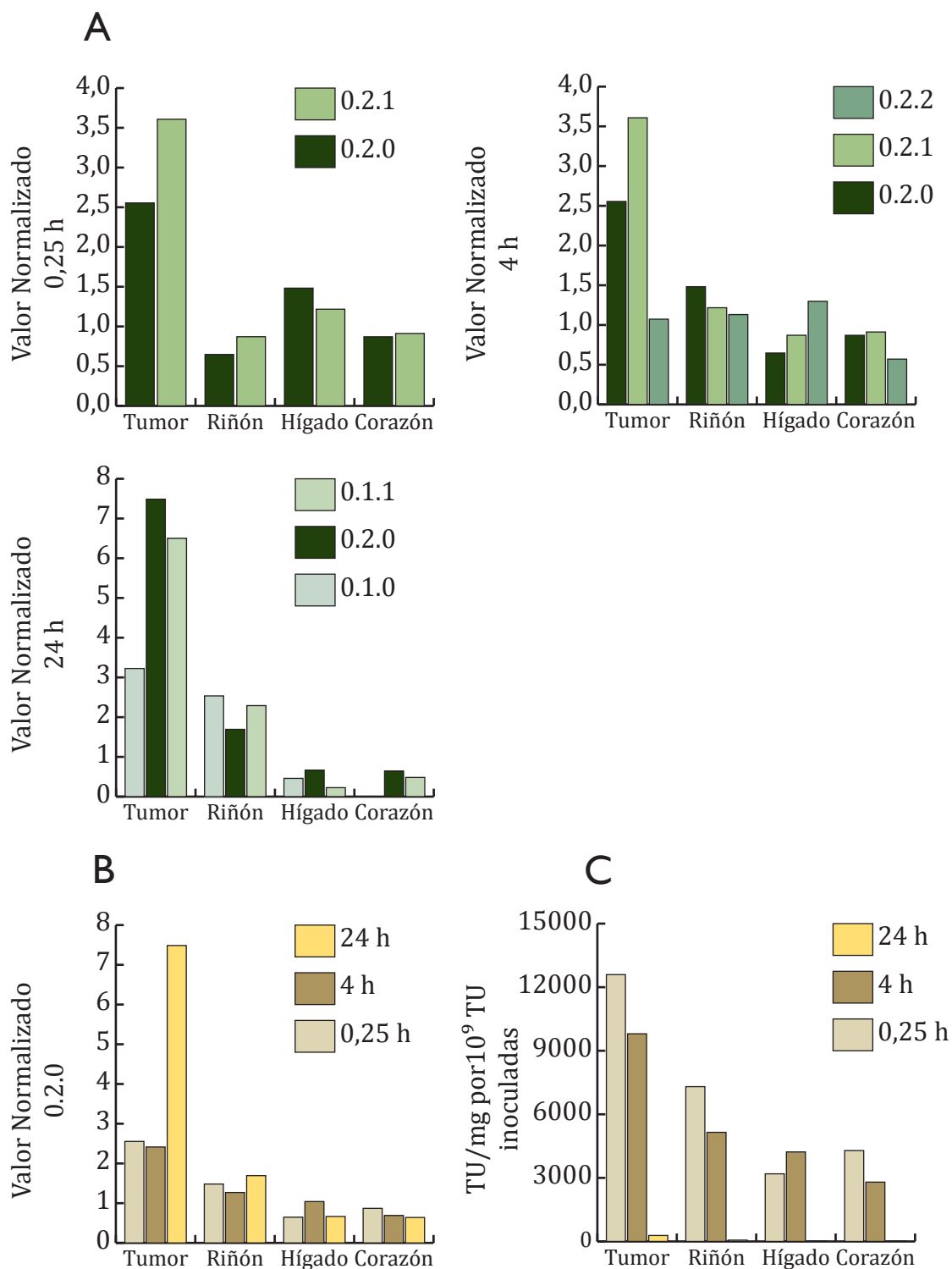


FIGURA 36. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CIRCULACIÓN EN EL MATERIAL RECUPERADO.

A) Se estudió la variación en el valor normalizado obtenido para distintas rondas de selección en función del tiempo de circulación permitido (15 min, 4 h o 24 h), en cada caso se escogieron las distintas rondas evaluadas (se mantiene la ronda 0.2.0 para facilitar la comparación). B) Comparación del valor normalizado obtenido empleando como repertorio inicial de selección *in vivo* el repertorio 0.2.0. C) Comparación del rendimiento total obtenido (calculado como TU por mg de tejido, por cada 10^9 TU inoculadas) en función del tiempo de circulación permitido empleando el repertorio 0.2.0.

expuestas en el endotelio; sin embargo, es posible que sea insuficiente para obtener partículas que sean capaces de extravasar e identificar antígenos en el estroma [Molek *et ál.* 2011]. En la literatura aparecen ejemplos de fagos filamentosos con una proteína de fusión con vidas medias entre 1,5 minutos y 16 horas [Molenaar *et ál.* 2002; Zou *et ál.* 2004]. Por ello, se realizó un estudio comparativo usando diferentes rondas de selección previas y tiempos de circulación entre los 15 minutos empleados en las selecciones mostradas previamente y las 24 h descritas en la literatura. Como valor intermedio se decidió usar 4 h conforme al valor de vida media de fagos silvestres publicado [Yip *et ál.* 1999].

En la Figura 36c se hace patente la disminución del número de partículas infectivas recuperadas al incrementar el tiempo de circulación. Apenas hay diferencias entre los dos primeros puntos (15 minutos y 4 horas); sin embargo, a 24 h, el total de partículas recuperadas del tumor es 40 veces menor, mientras que la diferencia en el resto de órganos es mayor de 100 veces (hasta 180 veces, el valor máximo observado, que corresponde a la diferencia entre el corazón a 15 minutos y a 24 horas). Es decir, al incrementar el tiempo de circulación se recuperan, en general, menos partículas infectivas. No obstante, esta disminución va acompañada de un aumento en el ratio tumor / órganos, es decir, aparentemente son partículas más específicas (Figura 36a,b).

Esto hizo que se reconsiderara la selección de clones candidatos, que, finalmente, se realizó a partir de diferentes rondas de selección *in vivo*, con períodos de circulación de 24 h (Figura 36a, 24 h). Para ello, el proceso fue fundamentalmente análogo al proceso previo, evaluando los parámetros (del 1 al 7) descritos en el apartado III.5.2.2.3.1 (Tabla 10).

Esos clones se dividieron en 3 grupos (A, B, C) que se administraron cada uno a un ratón portador de tumor con un tiempo de circulación de 24 h. La primera información, obtenida a partir del título, muestra una mayor recuperación de partículas del tumor que del resto de órganos en los tres grupos (Figura 37a). Sin embargo, al comparar la composición de las secuencias recuperadas (aproximadamente 300 analizadas por cada grupo) sólo destaca la distribución de las secuencias DAb05 y DAb10, con porcentajes incrementados en el tumor. Es decir, se recuperan más partículas del tumor, pero la proporción de los distintos clones sólo varía en las secuencias mencionadas. El comportamiento del clon empleado como control (anti- β -galactosidasa) es semejante

TABLA 10. SECUENCIAS SELECCIONADAS PARA LOS ENSAYOS DE COMPETICIÓN (DAb).

Clon	CDR1	CDR2	CDR3	CS	AAS	STOP	aa	MW	pI	(D+E)	(R+K)	Cys	I.I.	A.I.	Motivos
DAb01	GDNLID*T	IEDNDGST	AGDWYSYFAVRFADVRDTKVKS	6	1	-	121	13409,3	9,34	9	13	2	24,2	84,55	
DAb02	GFSVND*F	IAANNGST	AGEGWSAAGEDTMRS	9	0,3	32	121	12912,3	4,96	11	9	2	28,46	69,34	
DAb03	GDRVSYDD	IENPDGST	AGNTSDLWDHGWAKRTKEVPF	14	1	-	127	13900,3	5,28	14	12	2	34,79	69,06	110
DAb04	GFTFTA*A	IRNQNGST	AAAFG*ASPIGS	11	0,36	32,102	118	12505,9	7,98	8	9	2	30,25	73,64	
DAb05	GYRVITEF	INTQNGST	ASSVEEKNALRY	15	1	-	118	12881,4	8,64	9	11	2	27,63	78,47	
DAb06	GDTLSN*I	IAVTNGST	ATIVGLVGNKSMKF	17	0,6	32	120	12801,4	8,66	8	10	2	22,99	85,25	106
DAb07	GDTFIH*D	IREQNGST	ATSVGPAPYHMYF	15	0,6	32	119	12853,3	6,91	9	9	2	31,18	72,1	
DAb08	GFMLNY*Y	IRGDSGST	ATTWSGEHHFEY	10	0,6	32	118	12857,3	9,03	9	12	2	36,23	75,17	
DAb09	GYKVRP*D	IEGQGGST	ARFSLCQDAMGY	10	0,6	32	119	12900,4	7,88	10	11	3	34,25	71,26	
DAb10	GYNFSDED	ICGANGST	AASKDCMLEEYSMKS	10	1	-	121	13087,6	4,99	12	10	4	29,66	68,51	
DAb11	RR*AYRSD	IRTSNGST	AGVATVTSELT	3	0,6	32	119	12925,4	9,3	8	12	2	35,94	74,54	
DAb12	YAKLSDQN	IRNSNGST	ARLLVPTLVATTLTF	14	1	-	122	13229,9	9,3	7	11	2	30,05	85,49	
BGal	GVSITAES	ITMRDGST	ARARAMYPLRSSQLES	6	1	-	121	13069,6	9,04	8	11	2	37,98	71,74	102

CS: valor asignado en función de los residuos comunes con la secuencia consenso establecida para el grupo en jerárquico en el que se encuentra. AAS: valor asignado en función de la primera base tras los codones ámbar. STOP: posición del codón ámbar. aa: número de aminoácidos totales. MW: tamaño molecular. pI: punto isoelectrico. (D+E): total de aminoácidos ácidos. (R+K): total de aminoácidos básicos. Cys: número de cisteínas. I.I.: índice de inestabilidad. A.I.: índice alifático. Motivos: residuo en el que se ha identificado algún motivo ya descrito en la literatura (CendR, RGD,...)

en los tres grupos empleados, y supone el mismo porcentaje de los clones recuperados que el porcentaje previo a la inoculación, lo que refuerza la hipótesis de que existe una retención inespecífica de estas partículas en todo el organismo. DAbo2 y DAbo4 se comportan de una manera similar, y con una distribución anómala entre los órganos: suponen algo menos del 5% de las secuencias recuperadas del hígado, pero más del 20% (DAbo2) o del 12% (DAbo4) de las obtenidas del tumor, corazón o riñón.

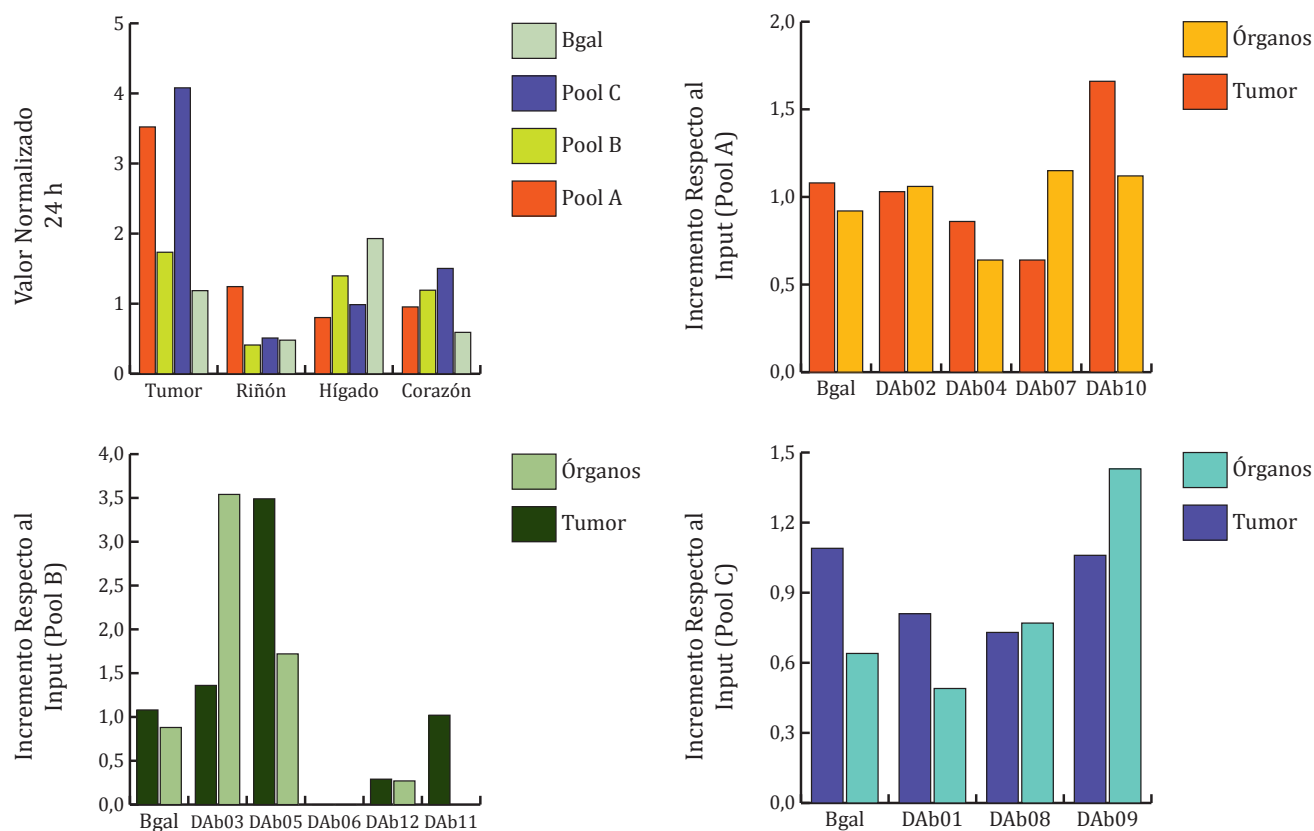
Al seleccionar las secuencias para estos ensayos de competición, uno de los parámetros evaluados fue la presencia, en alguno de los CDR —pero fundamentalmente en el CDR3— de motivos ya descritos en la literatura. En concreto, destaca la presencia de (potenciales) motivos CendR (R/K X X R/K), y la distribución de los mismos en los distintos repertorios obtenidos dado que hay un incremento en el número de secuencias que contienen estos motivos, especialmente de las recuperadas de órganos (Tabla 11). El clon DAbo3 es un ejemplo de este tipo de secuencias y se comprueba que, efectivamente, aunque se incrementa en torno al 150% en el tumor en el ensayo de competición, la recuperación de los órganos es 3,5 veces superior. No obstante, al distribuir el conjunto de secuencias en función del origen del que se obtuvieron (tumor u órganos) y estudiar la presencia y composición de este motivo, se obtienen secuencias consenso diferentes: (R/K) S Q (R/K) Q para el tumor y (R/K) (G/M) (L/R/T) (R/K) L para los órganos (la secuencia del clon DAbo3: KRTKE); sin embargo, no se incluyó en el estudio a ninguno de los clones con la secuencia consenso teórica frente a tumor por lo que esta observación no se ha podido evaluar.

TABLA II. EVOLUCIÓN DE MOTIVOS CENDR EN LAS SELECCIONES.

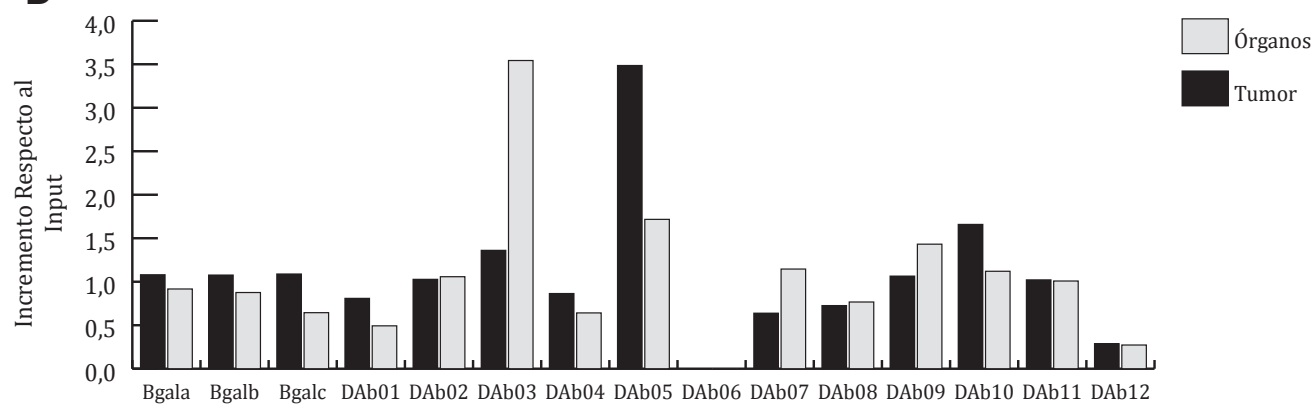
	Input	Output		Input			Input		
	o.1.0	Tumor	Órganos	o.1.1	Tumor o.1.1	Órganos	o.2.0	Tumor	Órganos
Porcentaje de CendR	14,7	8,7	3	8,9	2,1	10,8	2,2	12,2	29,3

Se ha evaluado la presencia de motivos CendR (R/K XX R/K) en los anticuerpos secuenciados. Hay un incremento de estas secuencias en el material recuperado de órganos. No se aprecia un incremento debido a la amplificación (el valor de 8,7 observado en el material recuperado tras una ronda de selección *in vivo* empleando el repertorio o.1.0; tras la amplificación para la siguiente ronda de selección se corresponde con el input identificado como o.1.1, con un porcentaje de 8,9).

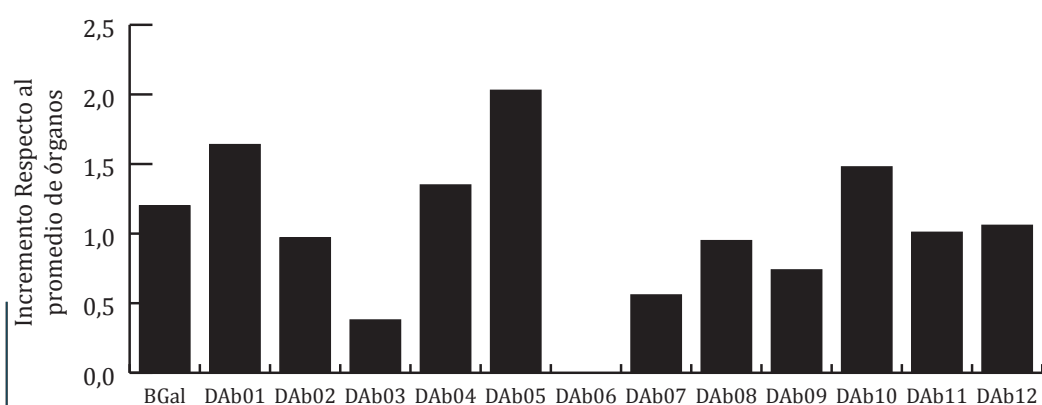
A



B



C



En la página anterior:

FIGURA 37. ENSAYO DE COMPETICIÓN CON UN TIEMPO DE CIRCULACIÓN DE 24 H.

A) Panel superior izquierdo: valores normalizados obtenidos para los distintos grupos empleados en el ensayo de competición. Incremento observado en el tumor y en órganos (incluye riñón, hígado, corazón, pulmón y bazo) respecto al porcentaje inicial del grupo A (panel superior derecho), del grupo B (panel inferior izquierdo) y del grupo C (panel inferior derecho). B) Incremento observado en el tumor y en órganos respecto al porcentaje inicial para cada clon empleado. C) Incremento observado en el tumor respecto al porcentaje hallado en órganos para cada clon empleado.

IV.2.2.2.2. Ensayos de localización

De estos ensayos de competición se escogieron 4 clones (DABo5 y DAb10, con mayor porcentaje recuperado del tumor respecto al porcentaje inicial; DABo2, con una distribución anómala en los órganos; DABo1, con una acumulación ligeramente mayor en el tumor que en los órganos), así como el clon de control para estudiar en detalle la acumulación tumoral realizando ensayos de localización (proceso similar a una selección *in vivo*, pero con un único fago monoclonal en un grupo de ratones). Tras la perfusión de los animales, parte del órgano se emplea para la titulación y otra parte se incluye para analizar la distribución del fago acumulado y la posible colocalización con marcadores conocidos. En dos ratones adicionales se inoculó una dilución 1:100 del fago monoclonal DABo5 con un doble objetivo: determinar si una menor cantidad de fago total en sangre favorece la localización específica y comprobar que el parámetro establecido para las comparaciones (relación entre el fago recuperado del tumor y el promedio de otros órganos) es un parámetro válido independientemente de la cantidad de material empleado (Figura 38).

Aunque el número de ratones empleado es insuficiente para asegurarlo, parece que el parámetro seleccionado (Valor Normalizado) es adecuado para comparar grupos de ratones que hayan recibido una cantidad distinta de fago, mientras que el valor de partículas virales infectivas recuperadas por cada miligramo de tejido es insuficiente para realizar esta comparación. Por otra parte, hay un incremento en la acumulación en el tumor, aunque la limitación derivada del reducido número de ratones empleados impide aseverarlo. Al estudiar este mismo parámetro en el clon de control, se observa que existe una ligera acumulación en el tumor y en el riñón respecto al hígado y al corazón (Figura 39a). Este comportamiento se ve reflejado (Figura 39) en el resto de los clones estudiados (el comportamiento de DABo1, aunque con una acumulación

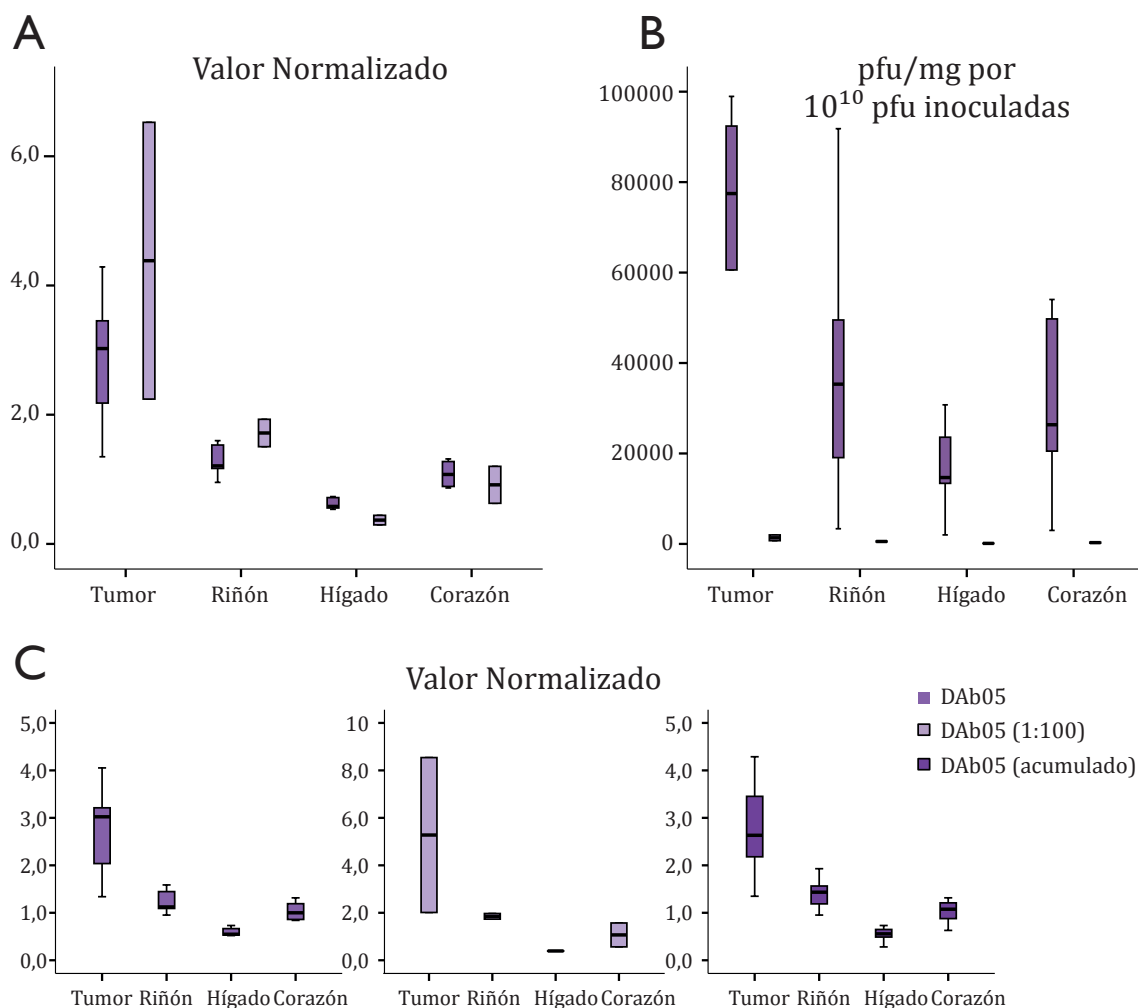


FIGURA 38. COMPARACIÓN ENTRE DOS GRUPOS DE RATONES QUE RECIBIERON EL MISMO CLON EN DOSIS DIFERENTES.

A) Valor normalizado, B) TU/mg por 10^{10} TU inoculadas, C) Valor normalizado en el grupo de dosis estándar (izquierda), en el grupo que recibió una dilución 1:100 de la dosis estándar (centro) y la combinación de los dos grupos (derecha).

tumoral algo mayor, prácticamente mimetiza el del clon de control). Se observan dos variaciones en el comportamiento del resto de clones: por una parte DAb02 presenta una mayor acumulación hepática y, por otra, DAb05 y DAb10 muestran una marcada acumulación tumoral —mayor que el clon de control, y mayor que la acumulación renal—.

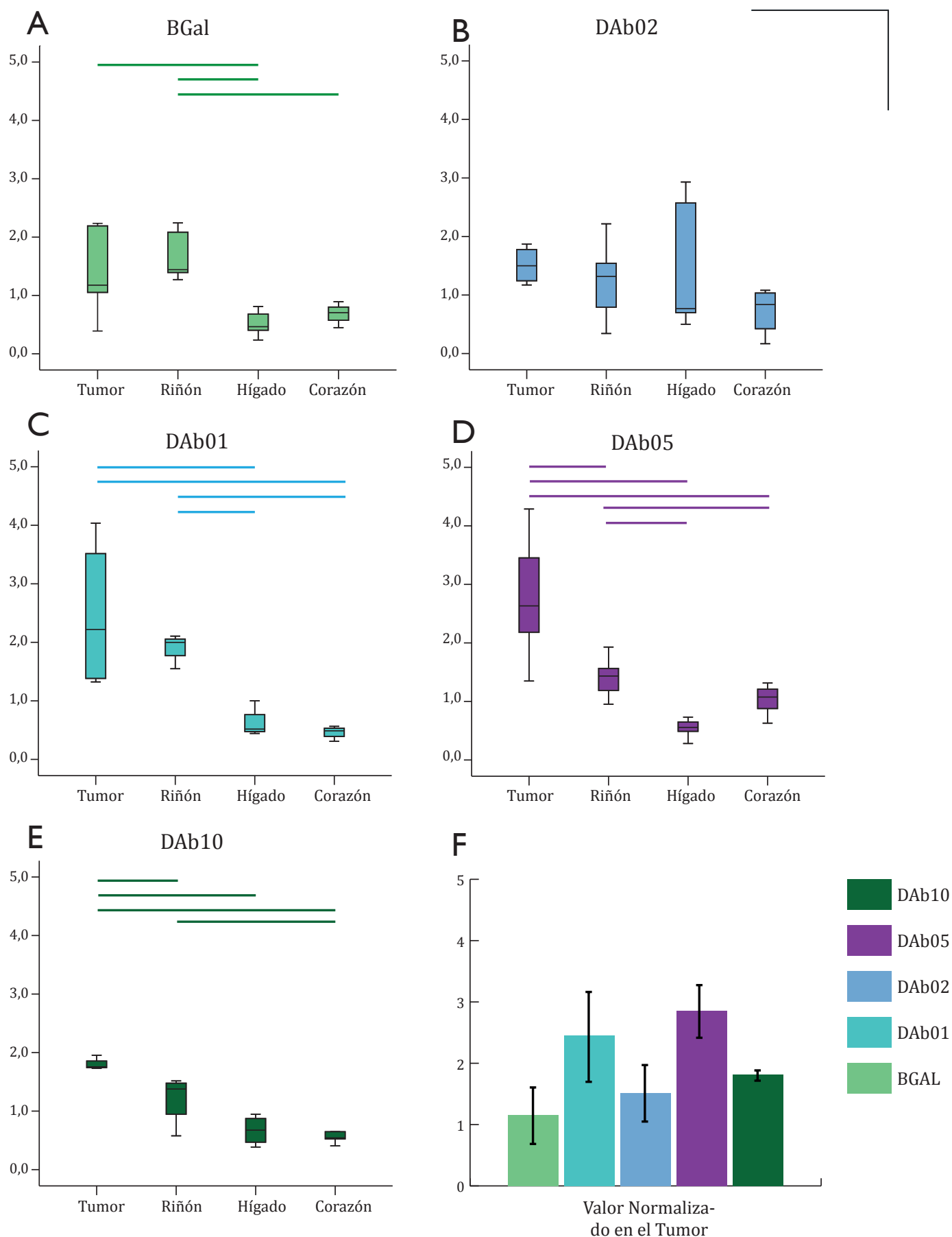


FIGURA 39. ENSAYO DE LOCALIZACIÓN *IN VIVO* A LAS 24 H.

A-E) Resumen de los ensayos de localización *in vivo*. Las barras horizontales representan diferencias significativas ($p < 0,01$ para el clon DAb05; $p < 0,05$ en el resto de los casos) según U de Mann-Whitney. F) Media \pm Error típico de la media.

IV.2.2.2.3. DAb05: distribución y cuantificación

A partir de los tumores y órganos empleados en la titulación de los ensayos de localización, se han realizado estudios sobre muestras congeladas (embebidas en OCT y almacenadas a -80 °C hasta el momento de la tinción) para analizar la distribución. A la vista de los resultados obtenidos en los ensayos de localización, y con la experiencia adquirida a lo largo de todas las selecciones *in vivo*, es llamativo el elevado fondo observado: de todos los órganos, incluso de los ratones que recibieron el fago de control, se recuperan partículas infectivas. Una explicación plausible puede ser, simplemente, una retención inespecífica —quizá mecánica ya que, al ser una partícula muy grande y con tendencia a interaccionar entre sí, puede formar entramados susceptibles de ser retenidos en capilares y vasos tortuosos—. Si esta explicación fuera cierta, cabría esperar que, al realizar una tinción con un anticuerpo específico frente al fago, y con un anticuerpo que identificase los vasos sanguíneos, hubiera una colocalización entre el fago y el vaso sanguíneo. Más aún, esta tinción podría ser útil para comparar no sólo el patrón obtenido entre un fago inespecífico (que seguiría el patrón descrito) y un fago específico (que podría mostrar otros patrones adicionales), sino para cuantificar las diferencias entre ambos.

Esta cuantificación parte de una serie de asunciones previas: los ratones empleados en los ensayos de localización fueron distribuidos de manera aleatoria en los distintos grupos y todos tenían, en el momento de realizar el ensayo, un volumen tumoral semejante. Se puede asumir que no sólo el volumen, sino también otras características del tumor (vascularización, zonas de hipoxia, zonas necróticas, etc.) son equiparables. Se asume también que en el período transcurrido desde la inoculación del fago monoclonal hasta su recuperación (24 h), independientemente de la especificidad del anticuerpo presentado en su superficie, la arquitectura general de la vasculatura no se ve afectada (incluso si hay unión al endotelio y esta interacción conlleva alguna lesión a la célula endotelial o al vaso, mientras permanezcan restos celulares detectables es suficiente). Si se asumen estas condiciones, se puede proponer que un grupo de tumores generados por la misma línea celular, transcurrido el mismo tiempo y del mismo tamaño puede tener una vascularización equivalente. Si de estos tumores se extrae un número suficiente de secciones para tener representado todo el volumen tumoral, se podrían comparar las áreas vascularizadas de distintos tumores —medidas como áreas

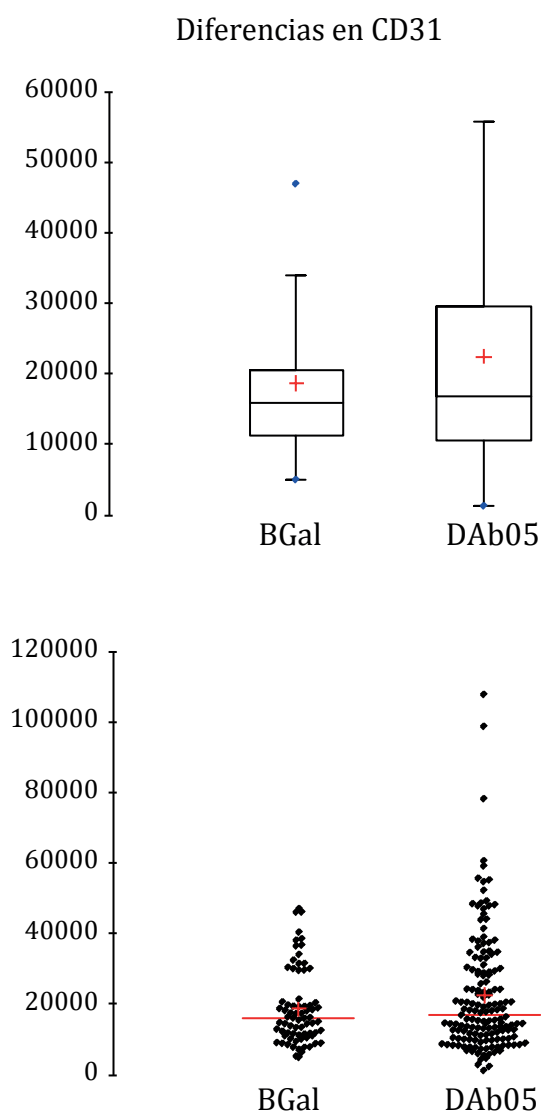


FIGURA 40. COMPARACIÓN EN LA VASCULARIZACIÓN ENTRE LOS DISTINTOS GRUPOS.

No hay diferencias en el área total positiva para CD31 en los tumores procedentes de distintos grupos de ratones.

positivas para la tinción con anti-CD31— y, si toda la serie anterior de premisas es cierta, deberían ser valores equiparables. De hecho, al realizar esta comparación entre una serie de seis secciones procedentes de tumores que habían recibido el fago control y seis secciones procedentes de tumores que habían recibido el fago monoclonal DAb05, se comprueba que no existen diferencias en el área total positiva para CD31, lo que parece confirmar la hipótesis previa (Figura 40).

Al intentar identificar el fago presente en estas secciones, hubo dos elementos destacados. A simple vista, el examen de unas secciones aleatorias parecía indicar una presencia mucho mayor en el tumor en el caso del clon DAb05 que en el clon control (Figura 41). Una diferencia mucho mayor de la presumible tras los datos obtenidos de titulación.

Además, existe una clara diferenciación cualitativa en la distribución de la tinción: en ambos casos hay una zona muy intensamente teñida en la periferia del tumor y una tinción asociada a la vasculatura, pero en el clon DAb05 se observa también una tinción mucho más extensa e irregular que no está restringida a la expresión de marcadores endoteliales.

Para cuantificar las diferencias observadas, se han empleado dos variables: la más inmediata, el área total positiva para la presencia de fago; y una segunda variable que incorpora tanto la información acerca de la presencia del fago, como la información

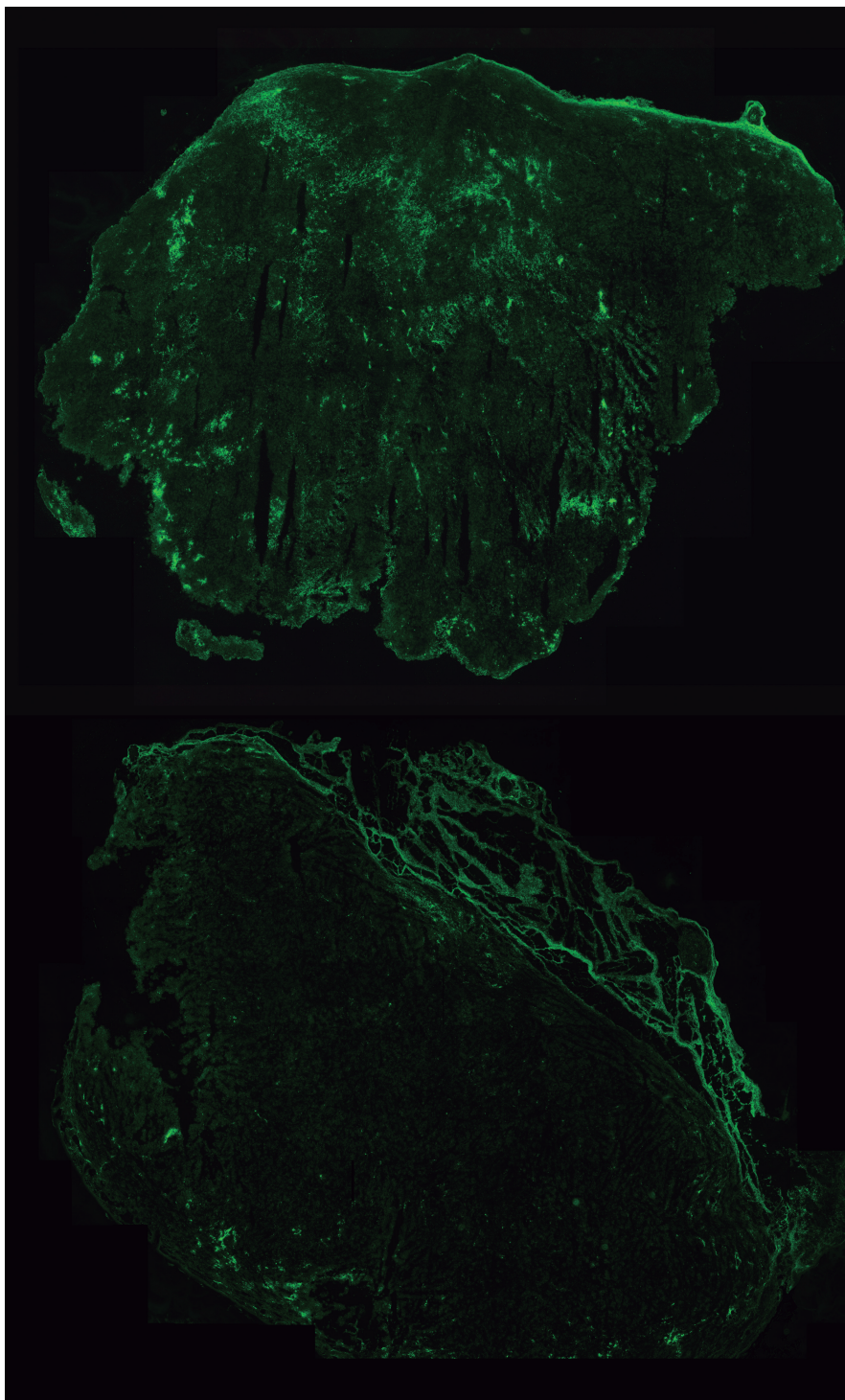


FIGURA 41. RECONSTRUCCIÓN DE LA SECCIÓN DE UN TUMOR 24 H DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DEL FAGO.

La sección correspondiente al tumor de un ratón que había recibido el clon DAb05 (superior) o BGal (inferior). Las condiciones de marcaje y de adquisición de las imágenes son idénticas en ambos casos. Se adquirieron entre 60 y 100 imágenes, con zonas de superposición entre ellas, que se ordenaron automáticamente empleando el programa ImajeJ. La revisión manual permitió resolver las asignaciones erróneas.

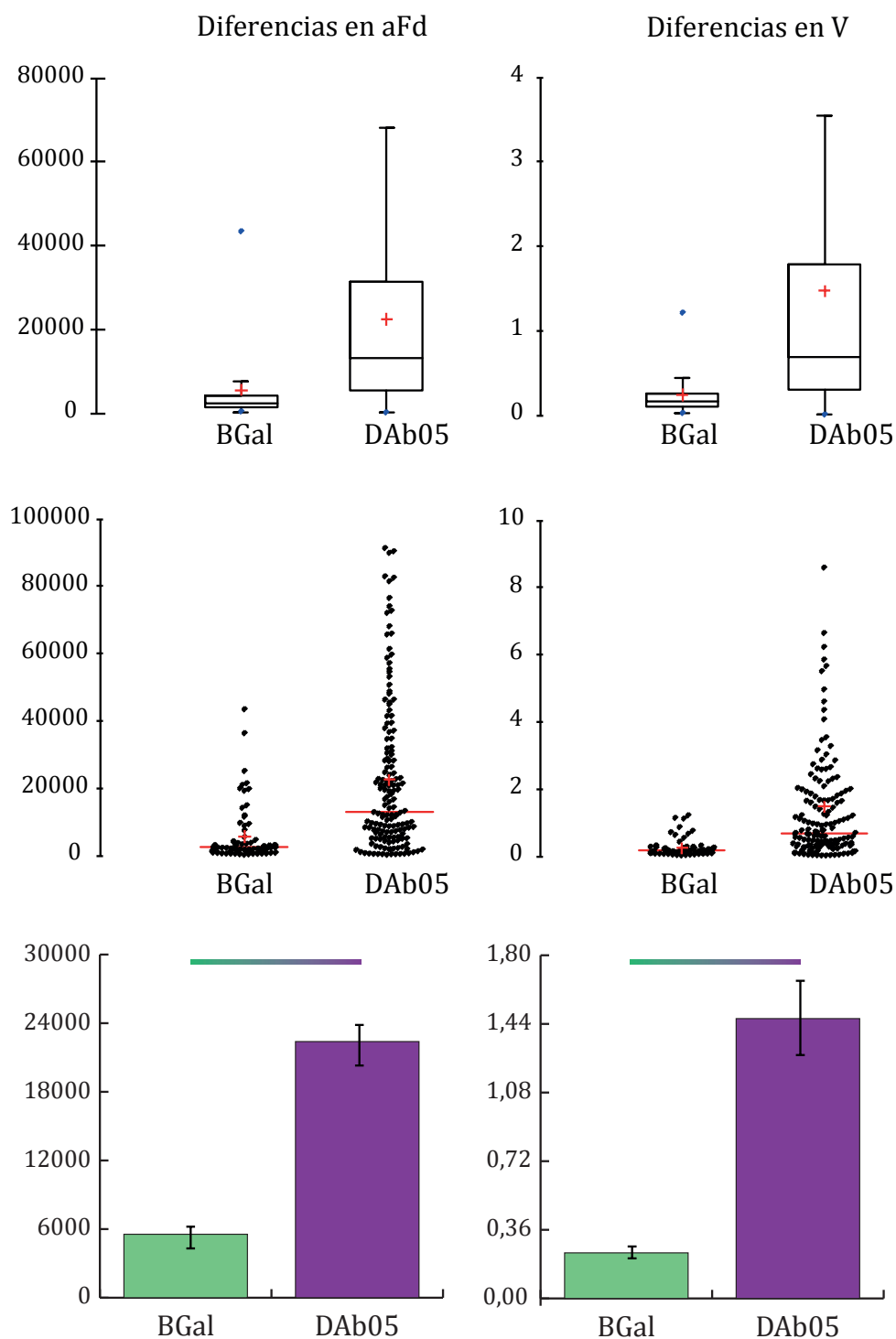


FIGURA 42. DIFERENTE ACUMULACIÓN DE FAGO SEGÚN SU ESPECIFICIDAD.

Comparación de la tinción específica para fago, en el panel izquierdo, y la variable transformada, en el panel derecho. Se han adquirido diez imágenes no superpuestas de cada sección en cada uno de los canales (o hasta cubrir toda la sección en el caso de preparaciones de menor área). El panel superior muestra el diagrama de cajas para los distintos grupos; el panel central muestra el gráfico de dispersión de los valores; el panel inferior muestra la media con el error típico de la media (la barra superior indica diferencias significativas, $p < 0,001$).

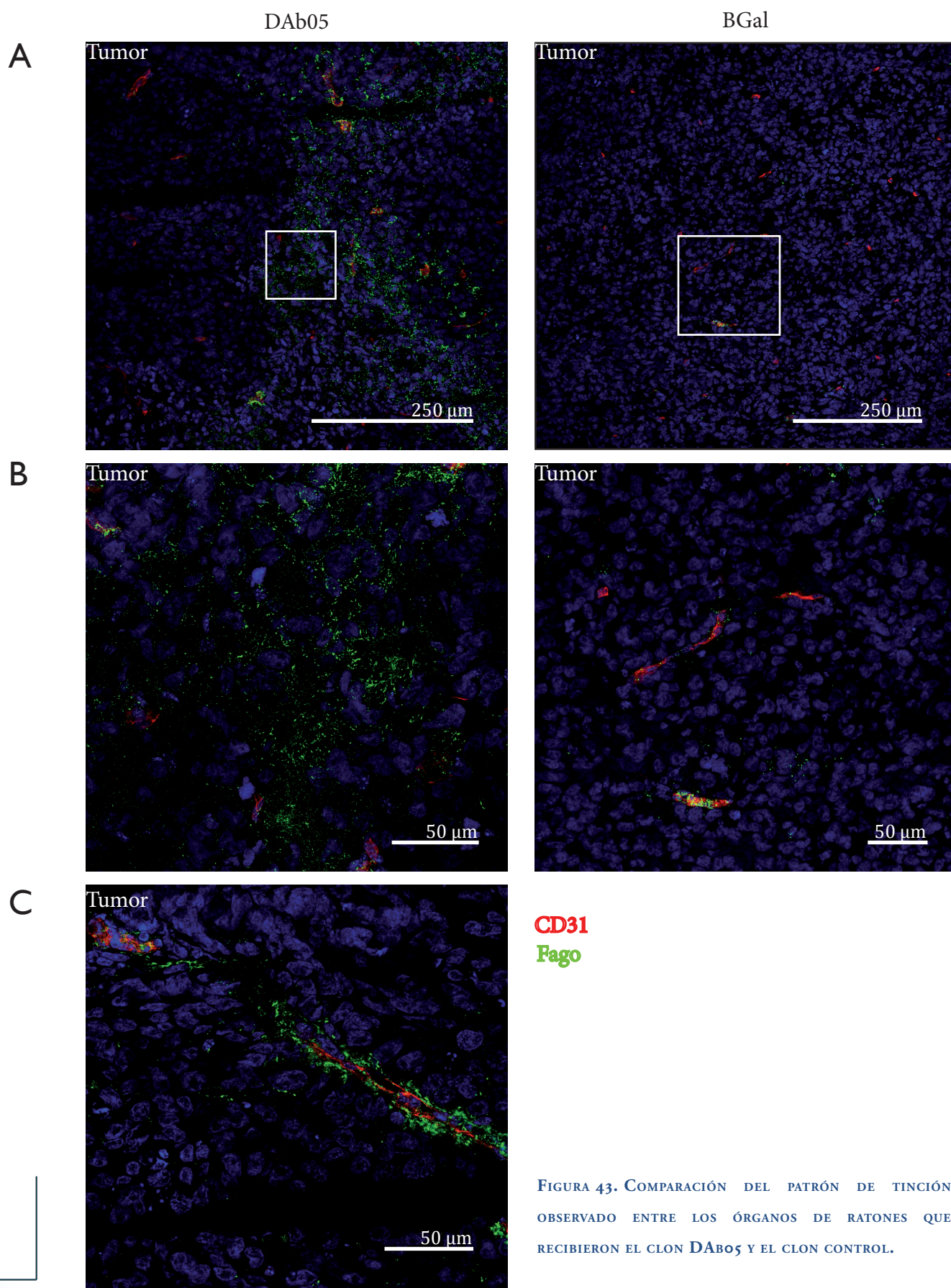
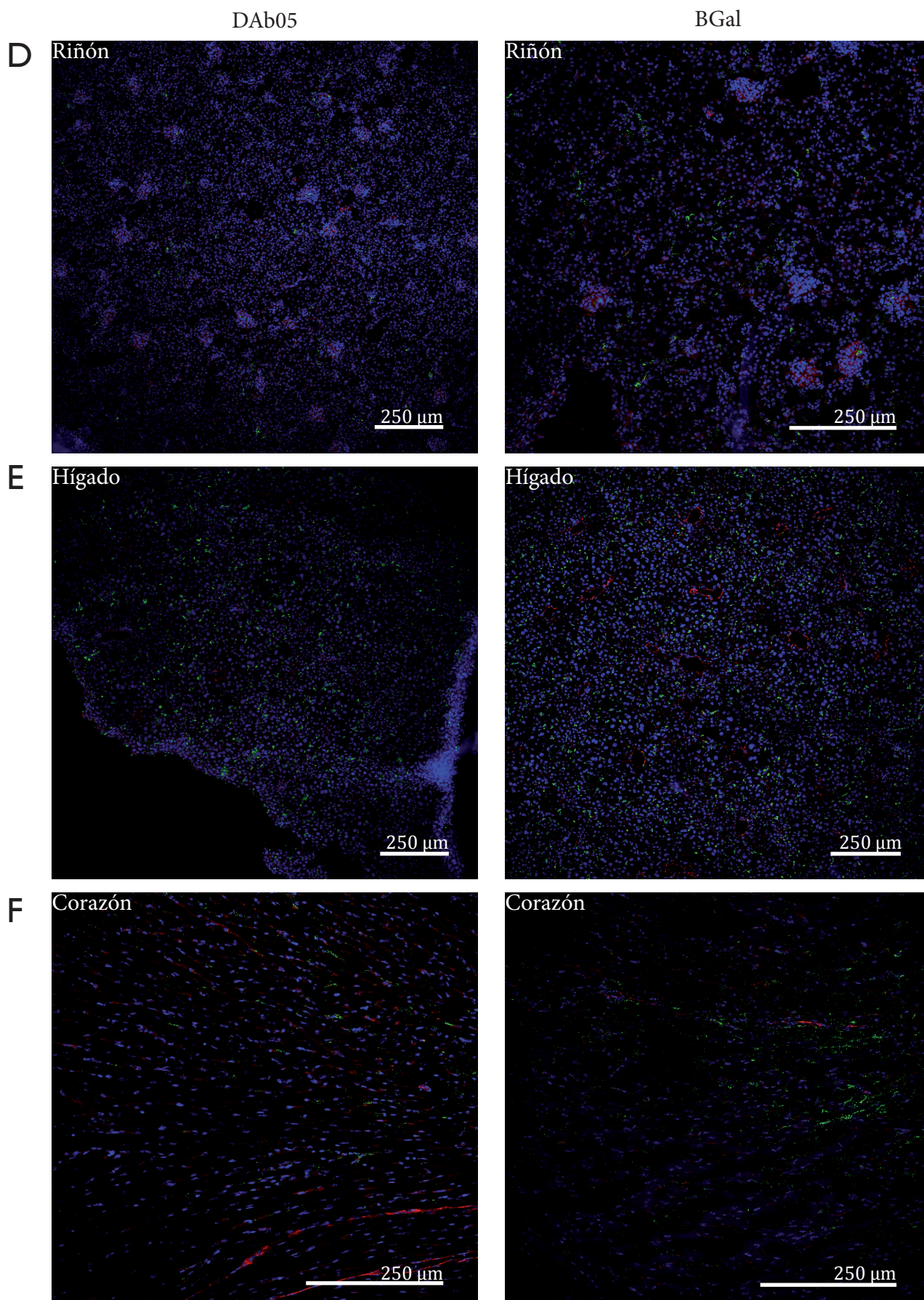


FIGURA 43. COMPARACIÓN DEL PATRÓN DE TINCIÓN OBSERVADO ENTRE LOS ÓRGANOS DE RATONES QUE RECIBIERON EL CLON DAb05 Y EL CLON CONTROL.

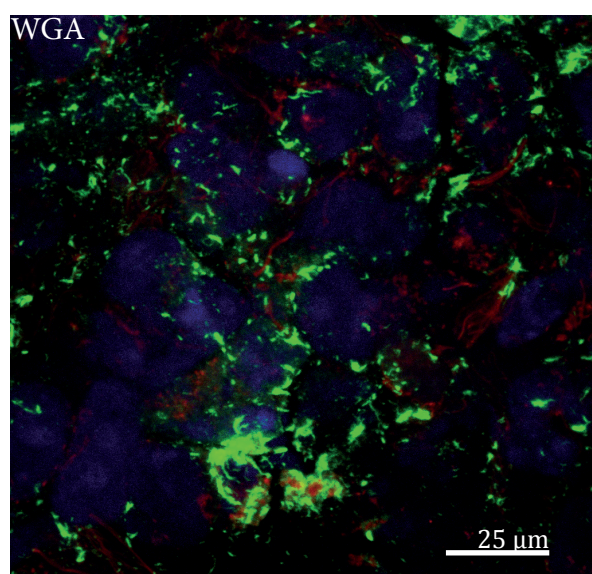
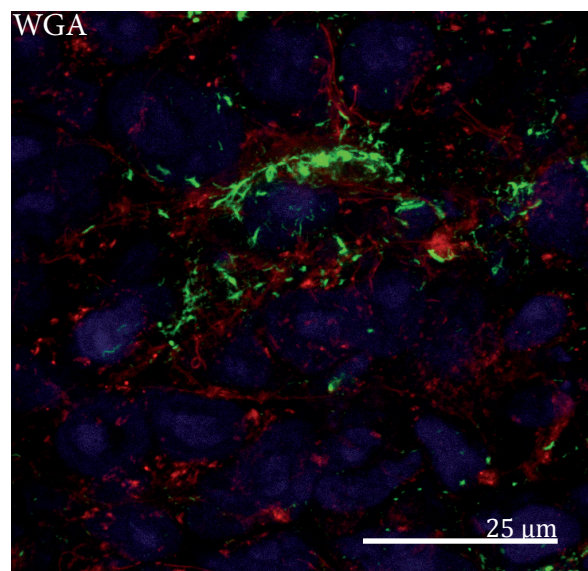
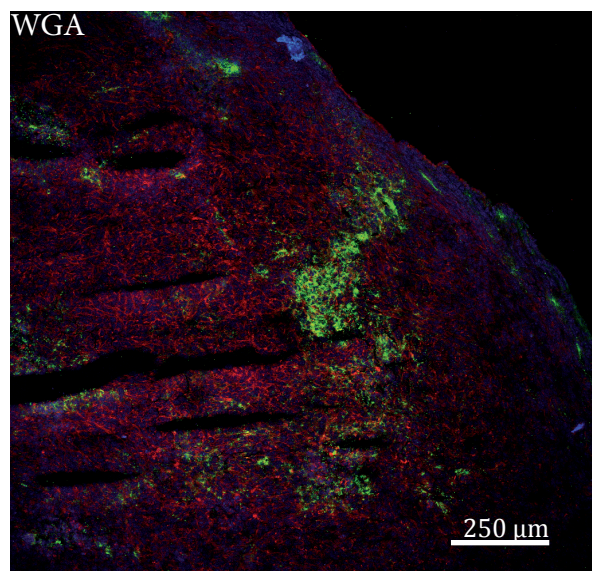
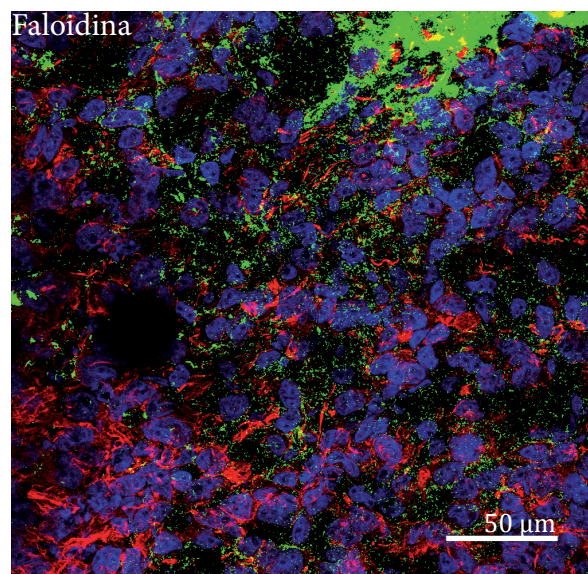
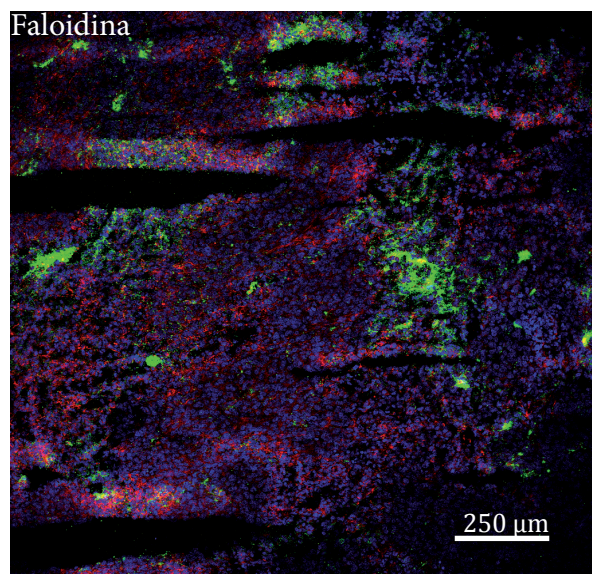


acerca de las células endoteliales (CD31⁺) presentes en la sección (se ha definido esta variable para cada una de las imágenes adquiridas como $V = a_{Fd}/a_{CD31}$; a_{Fd} = área total positiva para la presencia de fago, a_{CD31} = área total positiva para la presencia del marcador endotelial CD31). En la Figura 42 se representa esta comparación. Se puede comprobar que existe una gran dispersión en los valores de a_{Fd} y V correspondientes al clon DAb05; dispersión que se correlaciona con la irregularidad de la tinción que se observa en la Figura 41 (y que se reproduce en todas las secciones analizadas). Al mismo tiempo, se comprueba que hay una notable diferencia ($p < 0,001$, U de Mann-Whitney) entre las secciones de los ratones que recibieron el fago BGal ($V = 0,24$) y los que recibieron el fago DAb05 ($V = 1,47$), es decir, hay una diferencia de más de 6 veces el valor de BGal, algo que no se podía prever únicamente a partir de los datos de titulación.

Se ha estudiado la colocalización del fago presente en el tumor con distintos marcadores, con el objetivo de intentar dilucidar el mecanismo de extravasación, la localización de la diana, etc. En la Figura 43 se comparan detalles de la distribución del fago con la tinción endotelial (CD31) en el tumor de ratones que recibieron el clon DAb05 o el clon de control. Destacan tanto la dispersión de la tinción de DAb05, como la distribución circunscrita al vaso observada para BGal. En la Figura 43c se puede observar cómo el fago DAb05 no está recluido en la luz del vaso, sino que parece asociado a la cara subluminal.

Se aprecia una distribución semejante para el clon control y para DAb05 en órganos no específicos (Figura 43d). La tinción observada en el riñón está asociada, sobre todo, a glomérulos y capilares, mientras que la tinción hepática está deslocalizada y distribuida por toda la sección. En el corazón la tinción aparece mucho más ordenada ya que los fagos presentes se disponen de manera más o menos alineada en hileras paralelas que se asemejan a la distribución de capilares y fibras.

De las tinciones previas parece evidente que no existe una clara correlación entre la distribución del fago administrado y el componente endotelial. Con el objetivo de intentar determinar la localización celular del fago, se procedió a realizar una cotinción empleando una sonda específica de membrana (fitohemaglutinina) y una sonda específica de citoesqueleto (faloidina). Al comparar ambas tinciones (Figura 44), se comprueba que la distribución del fago es heterogénea: existen regiones en las que se



DAb05
Fago

FIGURA 44. TINCIÓN CON MARCADORES DE MEMBRANA Y DE CITOESQUELETO.

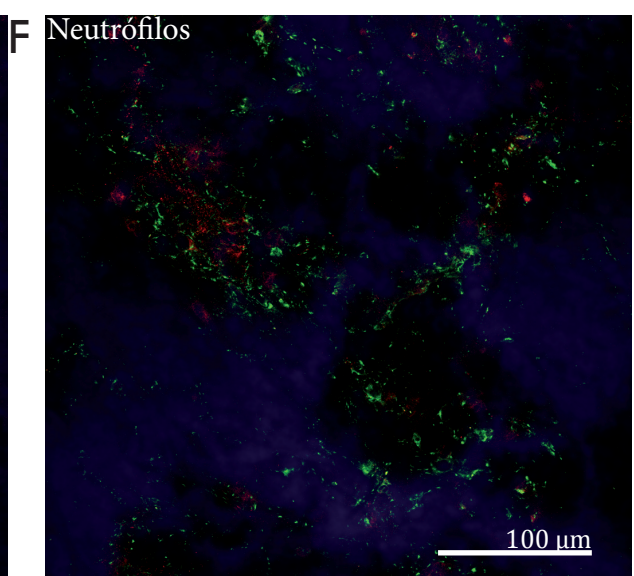
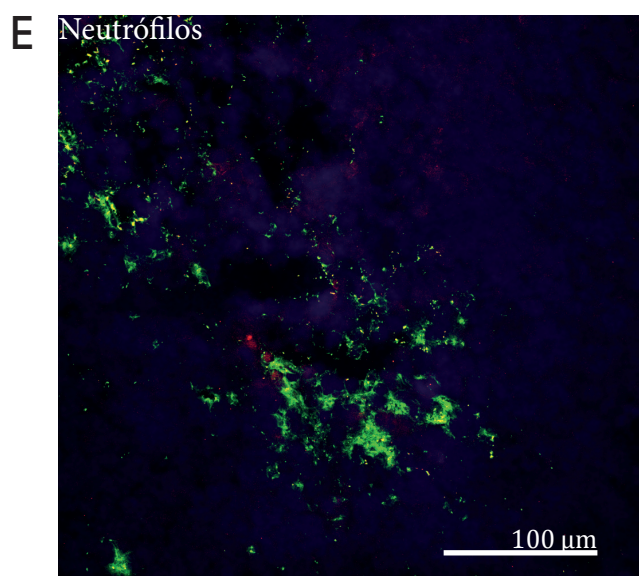
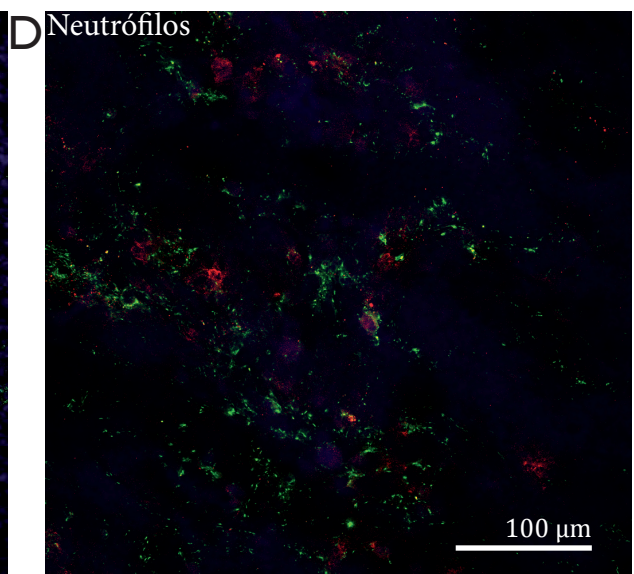
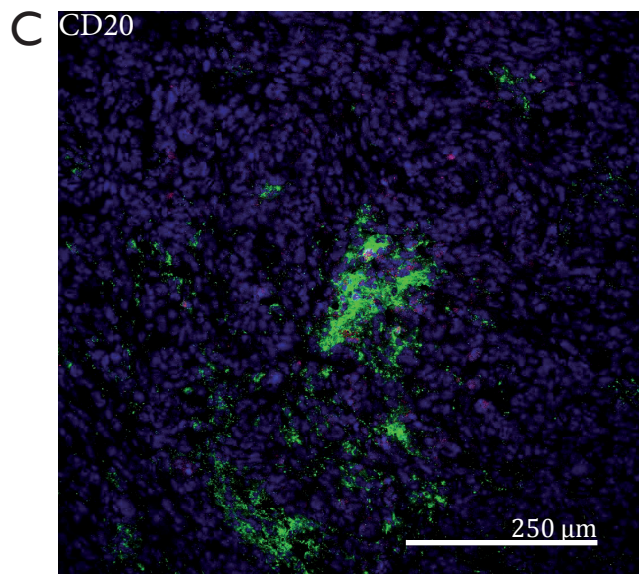
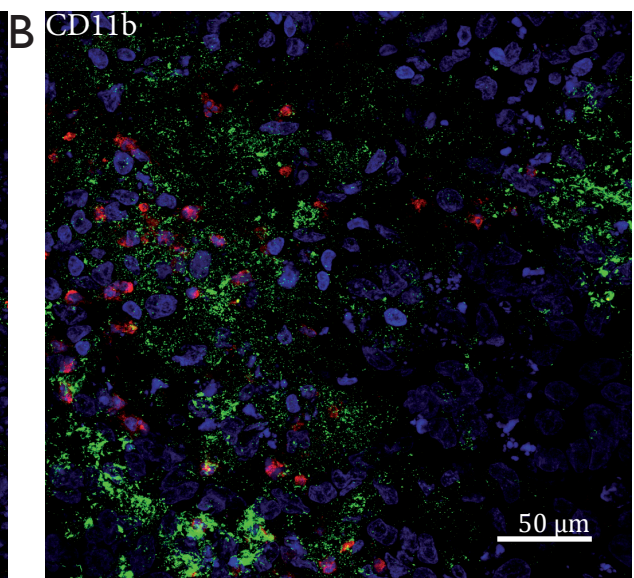
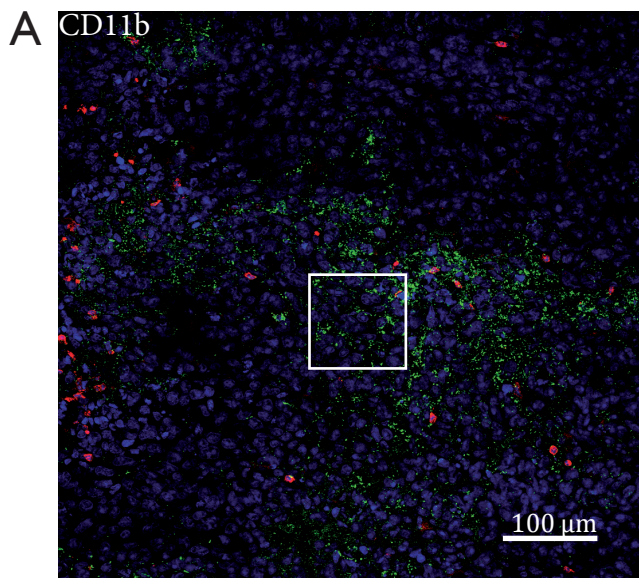
(Clon DAb05). La tinción del fago es heterogénea, hay ejemplos de tinción citoplasmática, de tinción asociada a la membrana y de tinción en el espacio intersticial (WGA, hemaglutinina de trigo).

aprecia una tinción intracelular, regiones con un marcaje asociado a la membrana y regiones que parecen corresponderse al espacio intersticial y que pueden deberse a la interacción con alguna proteína de la matriz, o a la retención mecánica de las partículas virales. Este patrón multicompartimental está, en ocasiones (como en el caso del ya mencionado p32), asociado con antígenos también presentes en macrófagos. Además, se considera que los macrófagos son fundamentales en el desarrollo y progresión del tumor [Qualls y Murray 2011]. Por ello, se estudió la presencia de células positivas para la integrina alfa M (CD11b) —presente en distintas células del linaje mieloide y NK—. Si bien existe una población de células positivas para CD11b que se relacionan, en mayor o menor medida, con la distribución del fago, la gran mayoría de las células positivas para CD11b se encuentran en regiones no asociadas con el fago. Al comparar la tinción entre el tumor que recibió el fago de control y el que recibió el fago DAbo5, se observó un patrón similar de células positivas distribuidas por todo el tumor. Sin embargo, al centrar el estudio en la población de neutrófilos, se pudo comprobar que la mayoría de los presentes en el tumor del ratón que había recibido el clon DAbo5 se encontraba asociado al fago, mientras que en el que había recibido el fago de control la presencia de neutrófilos era reducida (Figura 45).

Una hipótesis que explique la diferencia observada entre los tumores de los ratones que recibieron uno u otro clon se basa en las siguientes premisas: a) dado que los tumores sólo se diferencian en el clon recibido, parece razonable pensar que las diferencias observadas en las poblaciones celulares presentes hayan sido motivadas por la distinta retención de las partículas virales; b) el neutrófilo está involucrado en diversos mecanismos de defensa del organismo; entre otros, se le considera el principal responsable de la eliminación de bacterias y hongos, y se caracteriza por la capacidad de extravasación y de migración a través del espacio intersticial [Morris *et al.* 2008]. Por tanto, se puede plantear la hipótesis de que la acumulación del fago en el estroma tumoral puede iniciar una respuesta inflamatoria que favorece la extravasación de los neutrófilos —y la degradación de membrana basal y componentes de la matriz intersticial—.

En la página siguiente:

FIGURA 45. TINCIÓN CON ALGUNOS MARCADORES DE CÉLULAS FRECUENTEMENTE ASOCIADAS A TUMORES. (Clon DAbo5). A-B) Aunque hay alguna región en que la tinción del fago se asocia con la presencia de CD11b, esto sólo ocurre en determinadas regiones tumorales. C) En general hay escasas células B dispersas por el tumor. D-F) En el tumor que recibió el fago DAbo5, existe un incremento de neutrófilos respecto del tumor que recibió el anticuerpo de control. Este incremento se encuentra, además, asociado con la región en la que se distribuye el fago.



IV.2.2.2.4. Identificación de la diana

Aunque las tinciones realizadas sobre cortes de tumores y de órganos han sido útiles para resaltar las diferencias entre el clon DAb05 y el clon de control, no han proporcionado información detallada sobre el antígeno reconocido por el anticuerpo recombinante. Por ello, se planteó una estrategia para la identificación de la diana basada en la capacidad de purificación del anticuerpo recombinante en formato soluble —en cantidades suficientes para acoplarlo a una columna de 1 ml con una matriz de sefarosa activada— y en la capacidad del anticuerpo acoplado a la columna para retener el ligando al hacer circular por la misma un lisado tumoral.

Para trasladar los clones a una cepa supresora en la que producir el anticuerpo soluble, se infectó la cepa de *E. coli* HB2151 con los bacteriófagos BGal, DAb05 y DAb10. El resumen de las purificaciones se muestra en la Figura 46.

El acoplamiento del anticuerpo a la columna se realizó conforme a las instrucciones proporcionadas por el proveedor. Como comprobación tras el acoplamiento, se realizó una purificación empleando el anticuerpo de control (anti-BGal) y su antígeno (BGal) en concentración conocida diluido en PBS o en un lisado tumoral análogo al empleado posteriormente (Figura 47). Se recupera aproximadamente el 80% de la muestra diluida en PBS y el 60% de la muestra diluida en el lisado tumoral. Al analizar las fracciones recuperadas en un gel SDS-PAGE y tinción de plata (Figura 47c, carriles A y C) se aprecia una banda del tamaño esperado y varias bandas de tamaño intermedio que aparecen tanto en la fracción procedente de la dilución en PBS como en la fracción procedente del lisado tumoral. Estas mismas bandas se observan también en el carril que contiene 400 ng de la muestra comercial, lo que puede indicar que la proteína se degrada rápidamente. Al realizar un *Western Blot* con un anticuerpo policlonal generado en conejo frente a la proteína, todas las bandas son detectadas, y todas aparecen en el carril correspondiente a la proteína comercial. En todas las fracciones analizadas se puede detectar proteína del tamaño esperado, lo que sugiere que la columna no es capaz de mantener la totalidad de la proteína retenida y proporciona información acerca de la astringencia máxima de los lavados.

El extracto tumoral que se obtuvo de tres tumores se procesó a través de un esquema en serie de columnas de sefarosa conjugadas con los anticuerpos BGal, DAb05 y DAb10. En la Figura 48 se muestra el perfil cromatográfico obtenido al recircular

el lisado y los picos obtenidos de elución (con un área bajo la curva de 88,2; 51,2 y 73,7 mAu*min respectivamente). El volumen eluido (1,4 ml por cada columna) fue alicuotado, liofilizado y analizado por electroforesis (SDS-PAGE) y visualizado por tinción con SYPRO (Figura 48c). Se puede observar la existencia de bandas de distinta intensidad entre el eluido de la columna control y el eluido de la columna DAb05. Conforme al esquema diseñado, parece haber diferentes bandas de mayor intensidad en el carril correspondiente al anticuerpo control (procedentes de la interacción inespecífica) al tiempo que se detectan varias bandas en el carril correspondiente al anticuerpo DAb05, ausentes en el control. Estas bandas fueron seleccionadas para su identificación mediante trampa iónica. Los candidatos obtenidos para las bandas identificadas se presentan en la Tabla 12. En el resto de bandas no se consiguió identificar a ningún candidato.

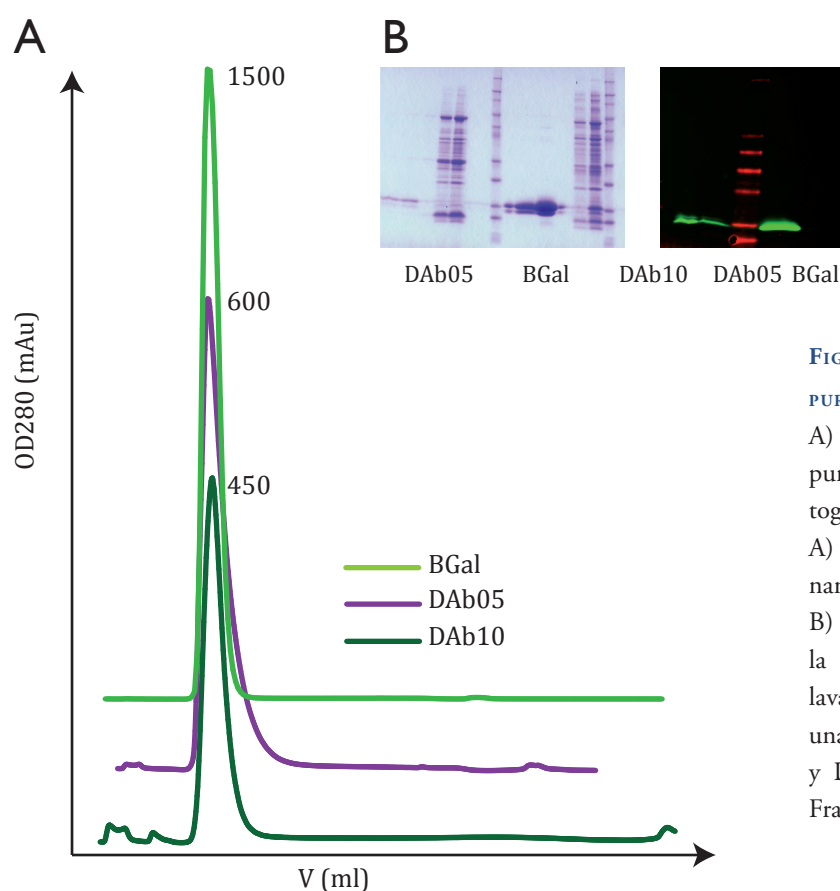


FIGURA 46. RESUMEN DE LA PURIFICACIÓN DE DAb.

A) Pico de elución típico en una purificación mediante cromatografía de afinidad (Proteína A) de los anticuerpos recombinantes BGal, DAb05 y DAb10. B) Tinción de Coomassie de la fracción periplásmica, el lavado y el pico de elución de una purificación típica de BGal y DAb05; *Western Blot* de las Fracciones seleccionadas.

A partir de los resultados obtenidos de la trampa iónica, se ha realizado una búsqueda en la base de datos del proyecto Atlas del proteoma humano (*Swedish Human Protein Atlas* [Uhlen *et ál.* 2010]) para obtener información de la expresión en tejido sano y tejido tumoral, con especial interés en los tumores de próstata, con la esperanza de integrar los datos disponibles con los resultados obtenidos en este trabajo para facilitar el proceso de identificación y validación posterior. La evaluación de la información disponible en el proyecto Atlas se expone a continuación.

La anexina A1 se ha propuesto como un posible marcador tumoral. Es una proteína que se localiza tanto en el citoplasma como en la membrana plasmática, aunque también se ha identificado en la membrana nuclear. Hay cuatro anticuerpos validados

TABLA 12. CANDIDATOS OBTENIDOS DE LA TRAMPA IÓNICA.

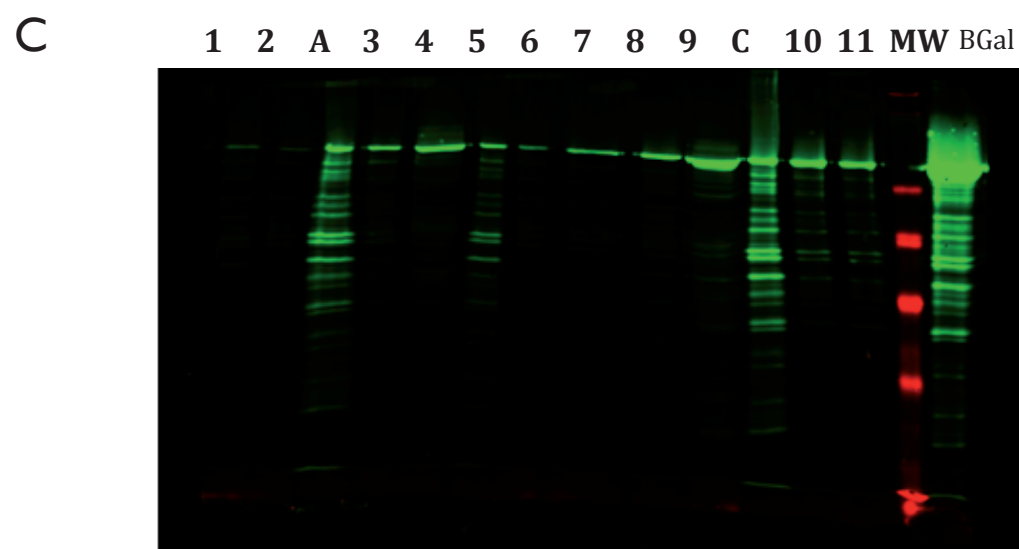
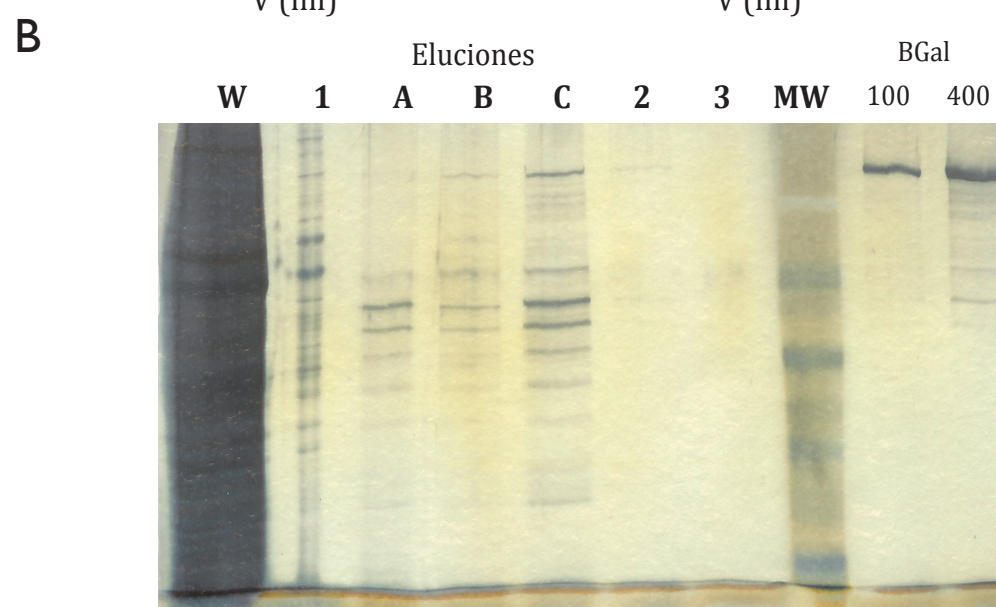
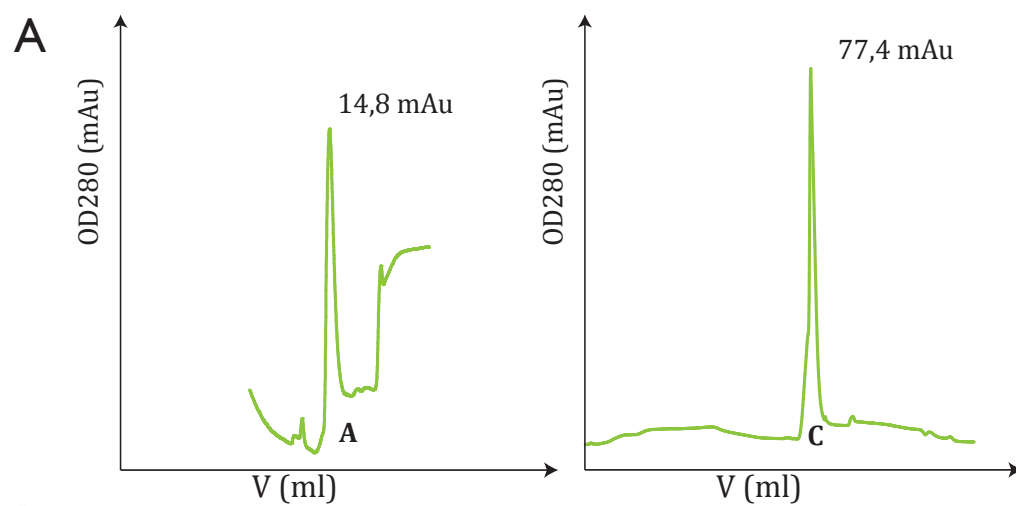
Descripción	aa	MW	pI	Score
Proteasa, serina, 1 (m)	246	26,1	4,94	144,16
Isoforma 1 of Arginasa-1 (h)	322	34,7	7,21	32,22
Isoforma 1 of Anexina A2 (h)	339	38,6	7,75	25,71
Anexina A1 (h)	346	38,7	7,02	31,48

aa: número de aminoácidos totales. MW: tamaño molecular. pI: punto isoeléctrico. (m): murina. (h): humana.

En la página siguiente:

FIGURA 47. PURIFICACIÓN DE BGAL USANDO UNA COLUMNA DE SEFAROSA CONJUGADA CON EL ANTICUERPO DAB ANTI-BGAL.

A) Pico de elución de la purificación de 40 µg de BGal disueltos en 10 ml de lisado tumoral (izquierda) o de 100 µg de BGal disueltos en 1 ml de PBS (derecha). B) Tinción de plata para la detección de la proteína purificada (W, lisado tumoral; 1, lavado; **A**, pico de elución al emplear 40 µg de BGal disueltos en 10 ml de lisado tumoral; **B**, pico de elución al emplear 10 µg de BGal disueltos en 1 ml de PBS; **C**, pico de elución al emplear 100 µg de BGal disueltos en 1 ml de PBS; 2, pico de elución al emplear 4 µg de BGal disueltos en 10 ml de lisado tumoral; 3, lavado; MW, marcador de peso molecular; 100, 100 ng de BGal comercial; 400, 400 ng de BGal comercial). C) Detección por *Western Blot* de BGal en las distintas fracciones usando un anticuerpo policlonal (1 y 2 son fracciones de lavado del lisado usando PBS; 3-9 distintas fracciones obtenidas incrementando la concentración de NaCl (de 0 a 2 M); 10 y 11 fracciones de lavado de la BGal disuelta en PBS; BGal, 100 ng de BGal comercial).



por el proyecto, de los cuales dos fueron generados por inmunización con fragmentos comunes a las anexinas A1 y A2 y otros dos por un fragmento del cual no hay información disponible. Los dos primeros apenas muestran tinción en secciones de tumores de próstata humanos, mientras que los dos segundos muestran una tinción moderada o intensa.

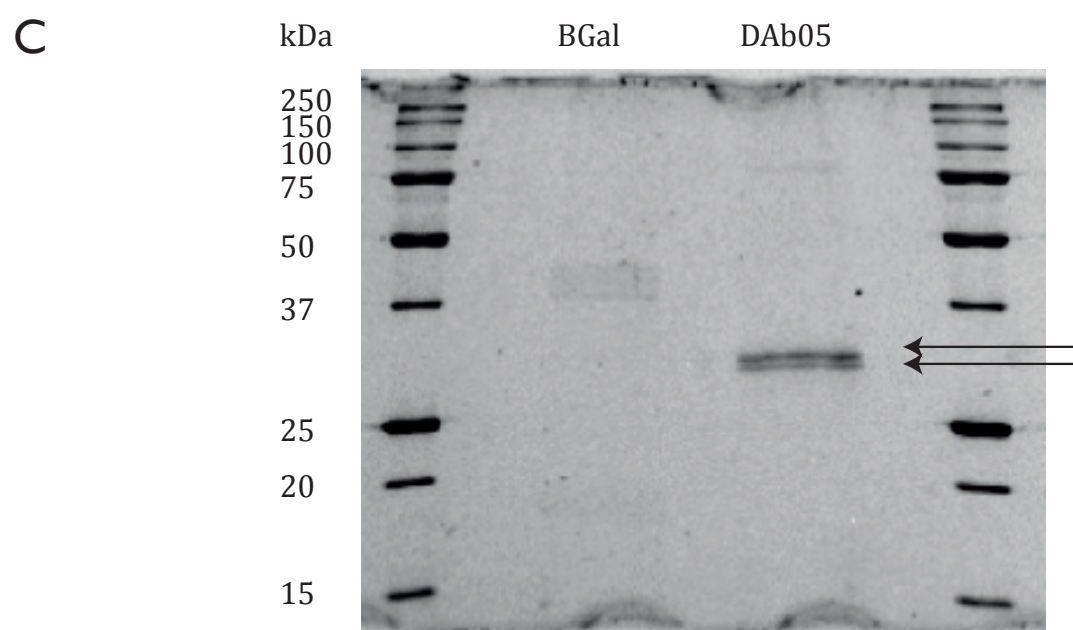
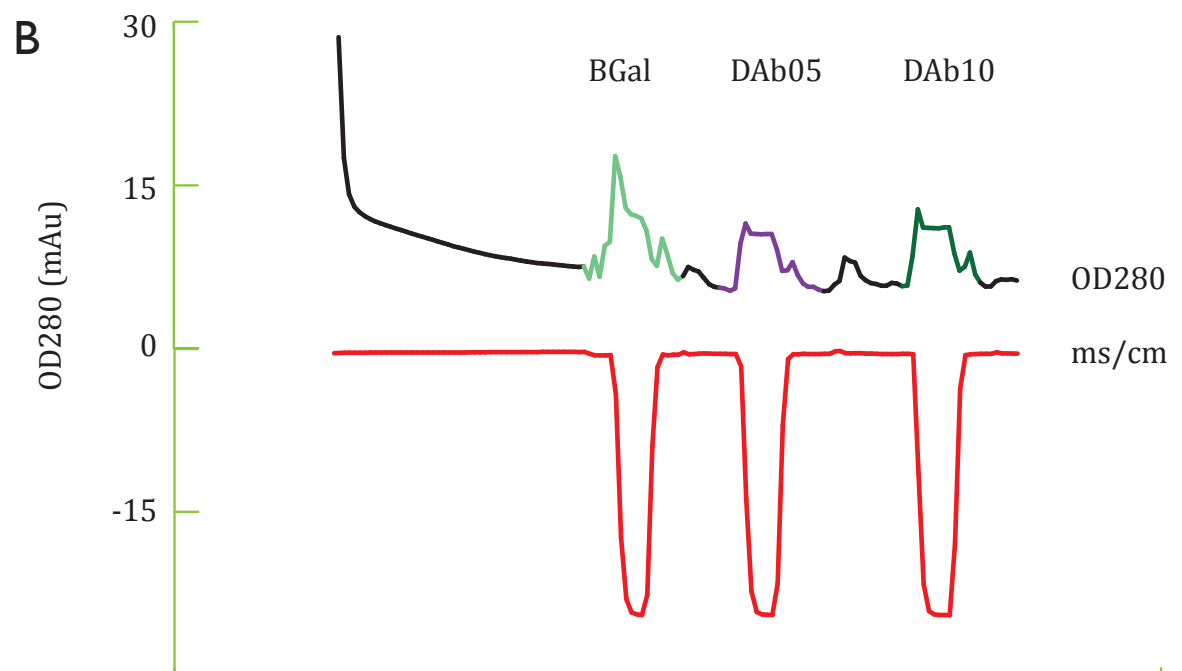
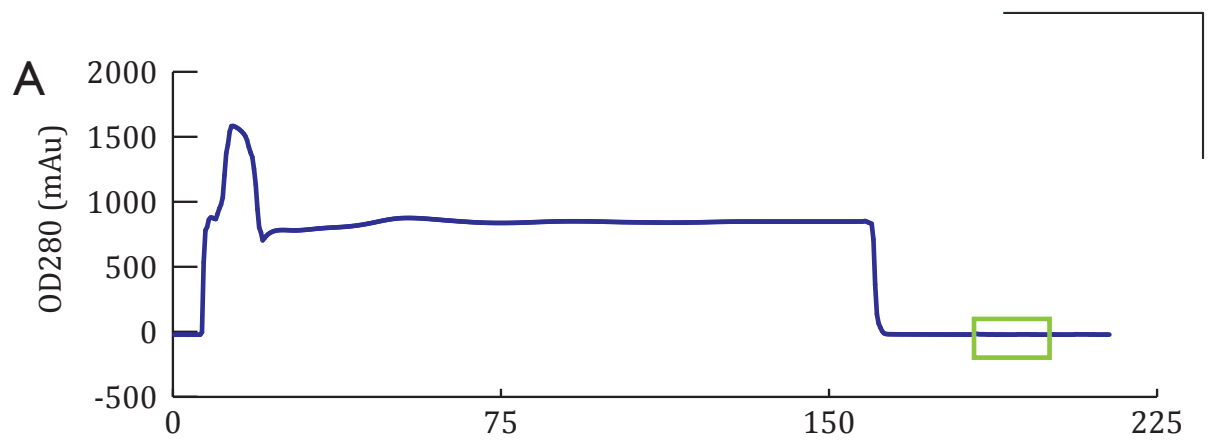
Además, la anexina A1 ha sido propuesta como diana terapéutica en cáncer de pulmón a partir de una aproximación proteómica en la que se subfracciona la membrana luminal del endotelio tumoral [Oh *et ál.* 2004]. Aunque es una proteína fundamentalmente celular, en el caso de neutrófilos que interaccionan con células endoteliales, puede ser liberada al medio una isoforma de 33 kDa que se ha relacionado con una respuesta inflamatoria. Este proceso de liberación de anexina A1 y activación del neutrófilo sólo se ha descrito cuando extravasan *in vivo*, por lo que se piensa que hay, además, un componente de interacción con la matriz extracelular [Oliani *et ál.* 2001]. Es llamativa la coincidencia de esta observación con el incrementado número de neutrófilos presentes en los tumores de los ratones que recibieron el clon DAb05. Si la diana fuese la anexina A1, un mecanismo plausible para la acumulación en el tumor sería (i) reconocimiento de la anexina A1 en el endotelio vascular o en el espacio perivascular [Raynal *et ál.* 1992; Oh *et ál.* 2004], (ii) acumulación del fago, (iii) infiltración de neutrófilos, y (iv) liberación de más anexina A1 que podía actuar como un elemento de retroalimentación positiva.

La anexina A2, si bien es detectada en el 92% de las muestras histológicas tumorales, también es detectada en la mayoría de tejidos y tipos celulares. Su expresión ha sido estudiada en series diferentes de tumores de próstata, con resultados dispares. Se ha encontrado una disminución en su expresión en la línea PPC-1 que se relaciona

En la página siguiente:

FIGURA 48. ESQUEMA DE LA PURIFICACIÓN A PARTIR DEL LISADO TUMORAL.

A) Cromatograma de la purificación a partir del lisado tumoral, en verde se señala la región correspondiente a las eluciones. B) Picos de elución de la columna con el anticuerpo BGal (verde claro), DAb05 (morado) o DAb10 (verde oscuro). C) Análisis por SDS-PAGE y tinción con SYPRO de las fracciones correspondientes a los picos de BGal y DAb05. Las flechas indican dos bandas de un peso molecular cercano a 30 kDa que se seleccionaron para ser analizadas en la trampa iónica.



con un incremento de la invasividad [Ding *et ál.* 2010]. También se ha descrito que, aun siendo cierta la disminución de la expresión de la anexina A2 en la mayoría de los pacientes con tumores de próstata, en ocasiones se produce un incremento en la expresión que se asocia con un mayor riesgo de recidiva [Inokuchi *et ál.* 2009]. En estos casos, se observa una tinción preferentemente citoplasmática, mientras que el patrón de tinción habitual en las células glandulares se encuentra asociada a la membrana.

La arginasa 1 es una enzima preferentemente nuclear que se ha descrito en carcinomas hepáticos, pero raramente en tumores de próstata. Se ha postulado que su expresión puede aumentarse en respuesta a andrógenos e incrementar así la capacidad de inmunosupresión, mientras que la inhibición de su expresión puede conducir a un descenso en la proliferación y en la capacidad de inmunosupresión local [Gannon *et ál.* 2010].

La serín proteasa 1 o tripsina 1, es una enzima eminentemente pancreática que se detecta muy raramente (menos del 3%) en cáncer (y, la mayor parte de este 3% está reservado a tumores pancreáticos) al emplear cualquiera de los dos anticuerpos disponibles en el proyecto Atlas. Sin embargo, en la literatura existen ejemplos de localizaciones aberrantes asociadas con distintos tipos tumorales (carcinoma de ovario, gástrico, de pulmón, colorrectal y en diversas líneas celulares), entre ellos en cáncer de próstata [Bjartell *et ál.* 2005]. Se ha descrito la acumulación de gránulos de secreción con la proteína en células lumbinales, indicando que en estas células también se puede producir la secreción de la proteasa a la matriz extracelular. Esta plausible liberación no sólo contribuiría a la degradación de la matriz sino que mediaría la activación de una plétora de metaloproteasas (incluyendo MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-8, MMP-9 así como procólagenasas y colágeno tipo I) que podría facilitar tanto el crecimiento tumoral como la invasión.

En general, en los sistemas de selección de repertorios peptídicos *in vivo*, la mayoría de los ligandos identificados son moléculas expresadas en la superficie de la célula endotelial. Esta es una diferencia característica respecto a modelos de selección *ex vivo* que está motivada por el sistema de selección. En la selección *ex vivo*, el repertorio se enfrenta a todo el componente celular del órgano diana, mientras que, en la selección *in vivo*, el repertorio contacta principalmente con la pared vascular. Además, el tiempo

de circulación estándar de 15 minutos puede no ser suficiente para permitir la extravasación de los fagos en función del tamaño de las fenestraciones vasculares [Gaumet *et ál.* 2008].

Con la estrategia de selección planteada en este trabajo —basada en repertorios de fagos filamentosos y tiempos largos de circulación— parece posible la identificación de ligandos que no son estrictamente vasculares. El clon DAbo5 seleccionado, muestra un patrón de tinción claramente diferenciado de la distribución vascular y, aunque la identificación del ligando no ha concluido, ninguno de los candidatos obtenidos se considera un marcador claramente vascular.

A partir de la revisión de información disponible acerca de las potenciales dianas, y de la información obtenida en este trabajo (fundamentalmente del patrón de tinción y del tamaño molecular), el candidato, *a priori*, más verosímil es la anexina A1, seguida por la anexina A2, tripsina 1 y, por último, la arginasa 1. No obstante, para dilucidar la molécula diana del clon DAbo5, se propone un estudio histológico sobre muestras de tumores —tanto de tumores que han recibido el fago como tumores generados de manera análoga a la seguida durante el proceso de selección— empleando anticuerpos frente a las distintas dianas para evaluar su distribución. Además, se ha de comprobar la capacidad del clon DAbo5 de reconocer su antígeno en un contexto compatible con los estudios de inmunohistoquímica (ya sea en tejido congelado o parafinado). En el caso de que el anticuerpo mantuviese la capacidad de interacción se evaluaría la colocalización al usar los anticuerpos frente a las distintas dianas. Además, se propone analizar la interacción entre el clon DAbo5 (en formato de fago y como anticuerpo soluble) frente a las proteínas diana comerciales mediante ensayos de ELISA.

Asimismo, en paralelo se puede proceder a evaluar la capacidad del anticuerpo soluble DAbo5 —en formato trimérico para incrementar su avidéz y tamaño— para localizar depósitos tumorales *in vivo* mediante imagen molecular con la tecnología validada con el anticuerpo anti-p32 2.15.

IV.3. REFLEXIONES FINALES

En un proceso ideal de selección a partir de un repertorio (ya sea de anticuerpos o de secuencias peptídicas cortas), a lo largo de las rondas de selección se obtendría un enriquecimiento en clones específicos frente a la diana empleada. Idealmente, todos los sitios potenciales de unión de la diana estarían ocupados por uno o varios clones. En el caso de una proteína purificada de tamaño medio, habrá, probablemente, cuatro o cinco regiones susceptibles de aceptar esta interacción de modo que —reduciendo el número de clones a uno por sitio potencial— de una selección ideal se obtendrían cuatro o cinco clones distintos y específicos para la proteína. En una selección *in vitro*, frente a un cultivo celular, en ausencia de selección negativa y, de nuevo, en condiciones ideales en las que todos los ligandos específicos fuesen recuperados, esta cifra se podría multiplicar fácilmente por mil (considerando que pueda haber cientos o miles de moléculas susceptibles de ser reconocidas en la superficie). Para reducir el número de secuencias y obtener sólo las que reconocen antígenos específicos de un tipo celular, se puede realizar una selección negativa que, idealmente, deplecione los ligandos comunes. Siguiendo con un proceso ideal, el número de secuencias probablemente fuese mayor en un contexto *ex vivo*, al haber más tipos de antígenos disponibles, mientras que el número de secuencias probablemente fuese menor *in vivo*, al haber una mayor presión en la selección negativa.

Este proceso ideal de selección estaría caracterizado por:

1. La capacidad de recuperación de todas las secuencias específicas presentes en el repertorio original frente a una diana, con independencia de su afinidad, así como la minimización de ruido en la selección (clones no específicos seleccionados).
2. Todas las secuencias estarían representadas en el mismo número en el repertorio original; en las subsecuentes rondas de selección, las posibles diferencias en el número de secuencias de cada tipo, son debidas, únicamente, a la interacción entre la secuencia y la diana.

En este caso, al repetir rondas de selección y la posterior amplificación, se produce un enriquecimiento progresivo en los clones específicos que conduce a la obtención de unos (todos los posibles) ligandos de interés.

Sin embargo, estas características distan mucho de ser reales en la selección *in vitro* frente a proteína purificada, y mucho más en escenarios más complejos. En la literatura se describen con frecuencia resultados de procesos de selección que parten de un repertorio con una diversidad superior a 10^9 en los que se obtiene un único ligando para una proteína, o cuatro o cinco frente a una célula (lejos de los miles que cabría prever). Probablemente, la causa que más contribuye a la discrepancia con el modelo ideal es la diferencia en el número de clones debida al proceso de amplificación. Cada secuencia tiene un coste metabólico, un uso de codones distinto, una estructura distinta, etc. Las características propias de cada secuencia afectan a factores como la velocidad de crecimiento de la bacteria que alberga el fagémido (o el virus, dependiendo de la construcción del repertorio), la velocidad a la que se multiplica el fago, la eficacia de los mecanismos de secreción, empaquetamiento o infección del fago, etc. Todos estos factores son dependientes de la secuencia de cada clon, pero independientes de la especificidad de la secuencia por la molécula diana. Derda y colaboradores [Derda *et al.* 2011] proponen un modelo (basado en repertorios de péptidos en fagos) en el que las dos fuerzas motoras del proceso de selección (capacidad de interacción con la diana y capacidad de amplificación) son independientes (Figura 49). Si la presión selectiva sobre la capacidad de interacción es nula, la selección ocurre al azar y la única fuerza de selección que actúa es la capacidad de crecimiento, lo que, en pocas rondas, conduce a una población homogénea formada exclusivamente por el fago silvestre. En cambio, si se incrementa la intensidad de la selección sobre la capacidad de interacción al antígeno, se puede reducir la presencia de secuencias no específicas con ventaja selectiva durante la amplificación, pero las secuencias específicas, con desventaja selectiva en la capacidad de amplificación se pierden del repertorio.

En el caso de la selección *in vivo*, existe un problema adicional respecto a las selecciones *in vitro*, en las que se puede incrementar la intensidad de la selección (disminuyendo la concentración de la diana o incrementando la astringencia de los lavados). En todos los experimentos *in vivo*, hay siempre un nivel basal de partículas virales en todos los órganos (incluida la diana) que se incrementa al aumentar la cantidad de repertorio inicial administrado (Figura 50). La presencia de este fondo, inespecífico, agrava aún más las posibles diferencias en el proceso de amplificación. Es por ello que

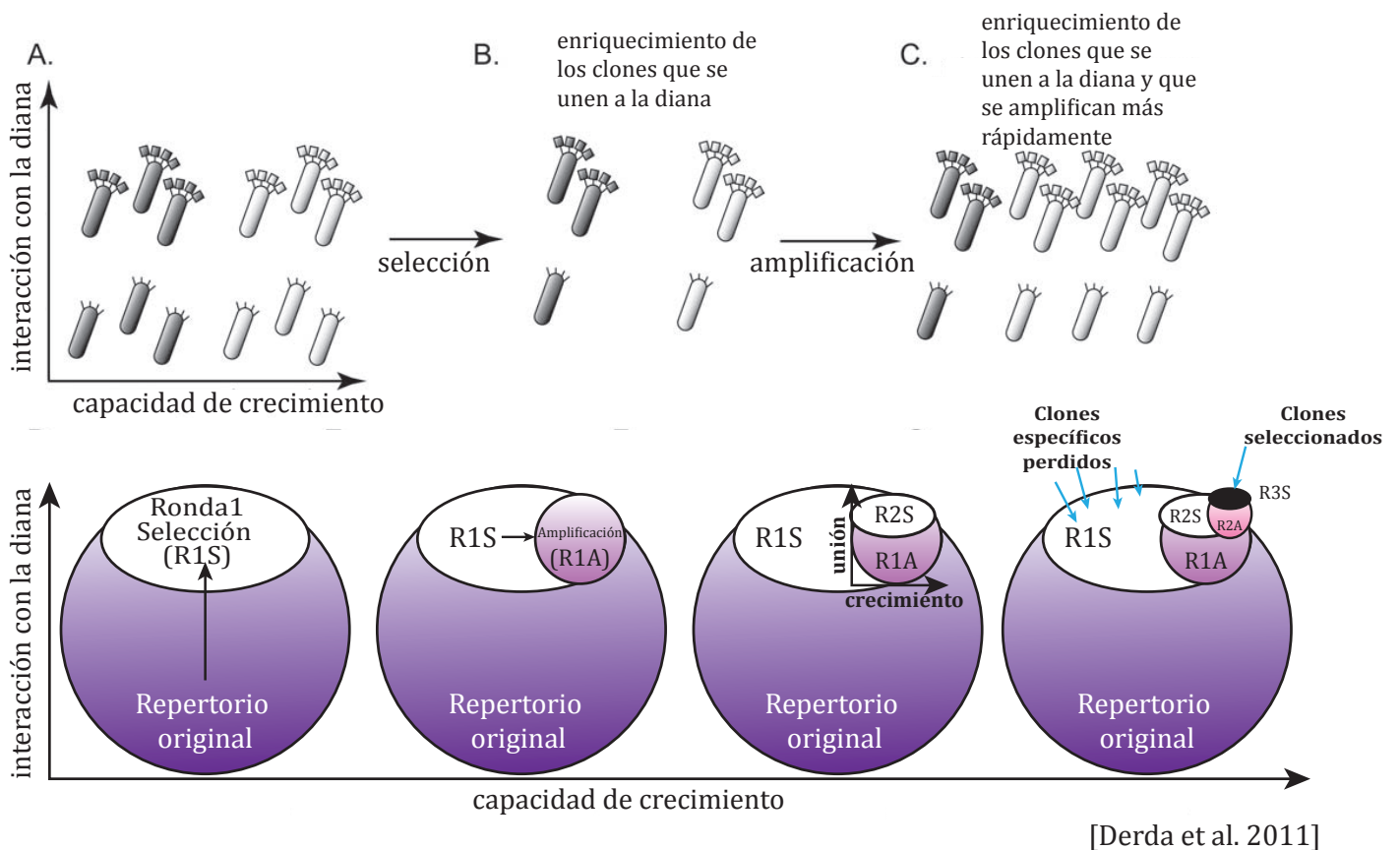


FIGURA 49. SESGO INTRODUCIDO POR LA CAPACIDAD DE AMPLIFICACIÓN EN EL PROCESO DE SELECCIÓN. Pérdida de clones específicos frente a la diana que desaparecen por una menor capacidad de producción. Modificado de [Derda *et al.* 2011].

se ha intentado reducir el número de rondas de selección totales en cada modelo. Sin embargo, esta reducción en el número de rondas supone una merma en la potencia del sistema de selección.

Una alternativa a esta problemática pasa por aplicar tecnologías de secuenciación masiva y realizar tan sólo una o dos rondas de selección. Otra estrategia pasa por asegurar la presencia de cantidades equivalentes de todas las partículas virales empleadas en la selección, haciendo que el proceso de amplificación se haga en compartimentos estancos para cada uno de los fagos eluidos. Aunque el sistema está diseñado para bacteriófagos replicativos, el fundamento sigue siendo válido para fagémidos: tras el proceso de selección se diluye el repertorio enriquecido en una solución con bacterias

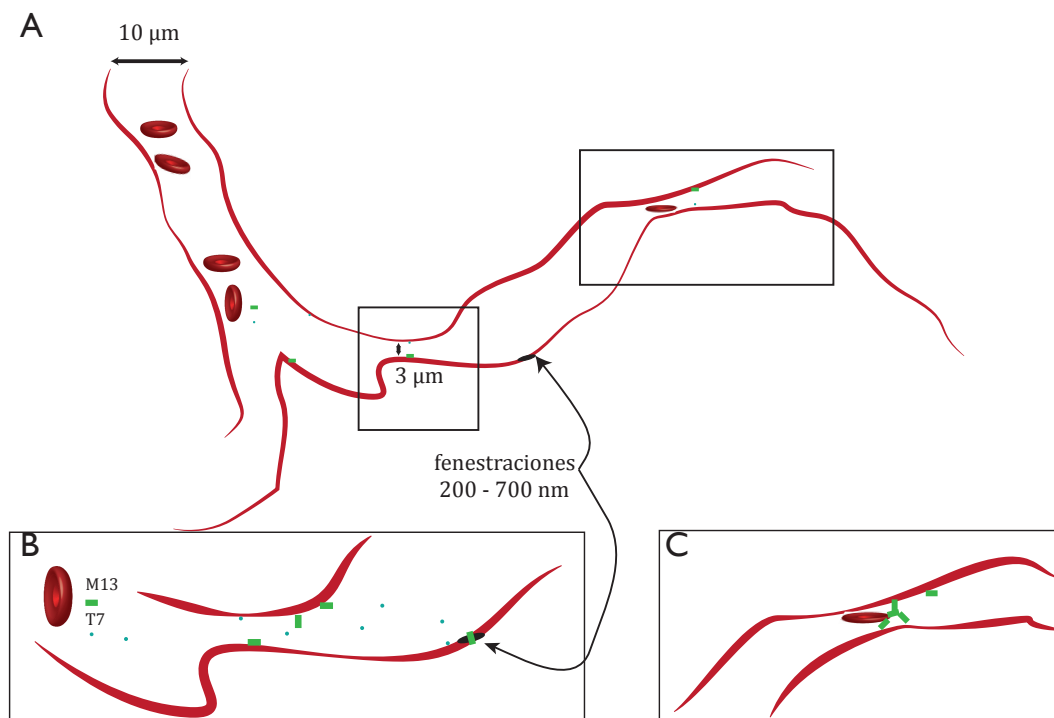


FIGURA 50. ESQUEMA DE LA CIRCULACIÓN A TRAVÉS DE UN CAPILAR: RETENCIÓN INESPECÍFICA Y FENESTRACIONES.

A) El repertorio de fagos circula a través del árbol vascular, e interacciona con las estructuras expuestas hacia el lumen. B) El tamaño de las fenestraciones tumorales puede permitir la extravasación de las partículas virales. C) En regiones especialmente tortuosas, si el número de partículas inoculado es suficiente, se pueden formar complejos capaces de obturar el capilar y que se retienen, al menos parcialmente, de manera inespecífica. (Fago M13, rectángulo verde, aprox. 900 nm de largo; Fago T7, círculo azul, aprox. 100 nm de diámetro).

y a continuación se produce la separación en los compartimentos (pequeñas gotículas monodispersas en las que hay como máximo un fago [Derda *et ál.* 2010]), en los que se realiza la obtención del fago.

Una medida que puede aliviar el efecto de los clones que presentan ventajas en la amplificación, pero que son independientes de secuencia, es su identificación. La estrategia de selección empleada en este trabajo facilita —o puede hacerlo cuando se incrementa el número de selecciones— la identificación de este tipo de secuencias, dado que no sólo se analizan las secuencias obtenidas del órgano diana, sino también de órganos de referencia que acumulan —al menos en principio— el fago administrado de manera inespecífica y se puede asemejar al repertorio inoculado. Adicionalmente, puede ser conveniente secuenciar de manera rutinaria el repertorio de partida de cada ronda de selección (es decir no sólo el material que se obtiene al final de una ronda de

selección, sino también el producto de la amplificación subsiguiente). La elaboración de una base de datos con las secuencias e información acerca de su origen puede ser una herramienta útil en la evaluación de futuros procesos de selección.



V. CONCLUSIONES

“Si suelto un martillo en un planeta con gravedad positiva, no necesito verlo caer para saber que en efecto ha caído.”

Mr. Spock.

CONCLUSIONES

1. La elección de p32 como diana de selección permite la obtención de anticuerpos recombinantes con capacidad de localización tumoral.
2. Esta capacidad de localización se incrementa al emplear anticuerpos multivalentes en formato trimérico.
3. La selección *in vivo* empleando repertorios de anticuerpos *scFv* es ineficiente, probablemente debido a la degradación del anticuerpo recombinante.
4. La selección *in vivo* empleando repertorios de anticuerpos en formato monodominio permite la obtención de anticuerpos con capacidad de localización tumoral.
5. El anticuerpo DAbo5 en formato fago es capaz de localizar depósitos tumorales y este reconocimiento no está restringido al componente endotelial.
6. La modificación de los parámetros de selección *in vivo* pueden proporcionar ligandos frente a moléculas expuestas en distintos contextos.
7. El sesgo introducido en la selección por la retención inespecífica debe ser cuidadosamente evaluado en los procesos de selección *in vivo*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

“—Dulce humildad —dijo Peregrino—. Pero hemos leído sus escritos, hija mía, y seríamos estúpidos si no buscáramos su sabiduría en un momento problemático.”

Orson Scott Card.

- Abramoff, M. D., P. J. Magelhaes y S. J. Ram (2004). "Image Processing with ImageJ." Biophotonics International **11**(7): 36-42.
- Aslakson, C. J. y F. R. Miller (1992). "Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor." Cancer Res **52**(6): 1399-1405.
- Barbas, C. F., 3rd, A. S. Kang, R. A. Lerner y S. J. Benkovic (1991). "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(18): 7978-7982.
- Batista, F. D. y M. S. Neuberger (1998). "Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate." Immunity **8**(6): 751-759.
- Better, M., C. P. Chang, R. R. Robinson y A. H. Horwitz (1988). "Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment." Science **240**(4855): 1041-1043.
- Bjartell, A., A. Paju, W. M. Zhang, V. Gadaleanu, J. Hansson, G. Landberg y U. H. Stenman (2005). "Expression of tumor-associated trypsinogens (TAT-1 and TAT-2) in prostate cancer." Prostate **64**(1): 29-39.
- Boder, E. T., K. S. Midelfort y K. D. Wittrup (2000). "Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 10701-10705.
- Boder, E. T. y K. D. Wittrup (1997). "Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries." Nat Biotechnol **15**(6): 553-557.
- Braun, L., B. Ghebrehiwet y P. Cossart (2000). "gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*." Embo J **19**(7): 1458-1466.
- Brothman, A. R., P. C. Wilkins, E. W. Sales y K. D. Somers (1991). "Metastatic properties of the human prostatic cell line, PPC-1, in athymic nude mice." J Urol **145**(5): 1088-1091.
- Buchsbaum, D. J., T. R. Chaudhuri, M. Yamamoto y K. R. Zinn (2004). "Gene expression imaging with radiolabeled peptides." Ann Nucl Med **18**(4): 275-283.

- Burton, G. F., M. H. Kosco, A. K. Szakal y J. G. Tew (1991). "Iccosomes and the secondary antibody response." *Immunology* **73**(3): 271-276.
- Carmeliet, P. (2005). "Angiogenesis in life, disease and medicine." *Nature* **438**(7070): 932-936.
- Clackson, T., H. R. Hoogenboom, A. D. Griffiths y G. Winter (1991). "Making antibody fragments using phage display libraries." *Nature* **352**(6336): 624-628.
- Clackson, T. y J. A. Wells (1994). "In vitro selection from protein and peptide libraries." *Trends Biotechnol* **12**(5): 173-184.
- Cuesta, A. M. y L. Álvarez Vallina (2009). Estrategias de multimerización para la generación de anticuerpos recombinantes con utilidad diagnóstica y terapéutica: 110 p.
- Cuesta, A. M., N. Sainz-Pastor, J. Bonet, B. Oliva y L. Alvarez-Vallina (2010). "Multivalent antibodies: when design surpasses evolution." *Trends Biotechnol* **28**(7): 355-362.
- Chester, K. A., R. H. Begent, L. Robson, P. Keep, R. B. Pedley, J. A. Boden, G. Boxer, A. Green, G. Winter, O. Cochet y et ál. (1994). "Phage libraries for generation of clinically useful antibodies." *Lancet* **343**(8895): 455-456.
- Christ, D., K. Famm y G. Winter (2006). "Tapping diversity lost in transformations-in vitro amplification of ligation reactions." *Nucleic Acids Res* **34**(16): e108.
- Christ, D., K. Famm y G. Winter (2007). "Repertoires of aggregation-resistant human antibody domains." *Protein Eng Des Sel* **20**(8): 413-416.
- Chung, W. Y., M. Sack, R. Carter, H. Spiegel, R. Fischer, T. R. Hirst, N. A. Williams y R. F. James (2008). "Phage-display derived single-chain fragment variable (*scFv*) antibodies recognizing conformational epitopes of Escherichia coli heat-labile enterotoxin B-subunit." *J Immunol Methods* **339**(2): 115-123.
- de Wildt, R. M., C. R. Mundy, B. D. Gorick y I. M. Tomlinson (2000). "Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions." *Nat Biotechnol* **18**(9): 989-994.
- Dedio, J. y W. Muller-Esterl (1996). "Kininogen binding protein p33/gC1qR is localized in the vesicular fraction of endothelial cells." *FEBS Lett* **399**(3): 255-258.

- Derda, R., S. K. Tang, S. C. Li, S. Ng, W. Matochko y M. R. Jafari (2011). "Diversity of phage-displayed libraries of peptides during panning and amplification." Molecules **16**(2): 1776-1803.
- Derda, R., S. K. Tang y G. M. Whitesides (2010). "Uniform amplification of phage with different growth characteristics in individual compartments consisting of monodisperse droplets." Angew Chem Int Ed Engl **49**(31): 5301-5304.
- Ding, T., L. Yang, Y. Wang, J. Yuan, T. Chen y X. Cai (2010). "Down-regulation of annexin II in prostate cancer is associated with Gleason score, recurrence, metastasis and poor prognosis." Mol Med Report **3**(5): 781-787.
- Dudgeon, K., K. Famm y D. Christ (2009). "Sequence determinants of protein aggregation in human VH domains." Protein Eng Des Sel **22**(3): 217-220.
- Eggleton, P., B. Ghebrehiwet, K. N. Sastry, J. P. Coburn, K. S. Zaner, K. B. Reid y A. I. Tauber (1995). "Identification of a gC1q-binding protein (gC1q-R) on the surface of human neutrophils. Subcellular localization and binding properties in comparison with the cC1q-R." J Clin Invest **95**(4): 1569-1578.
- Famm, K., L. Hansen, D. Christ y G. Winter (2008). "Thermodynamically stable aggregation-resistant antibody domains through directed evolution." J Mol Biol **376**(4): 926-931.
- Ferrara, N. y R. S. Kerbel (2005). "Angiogenesis as a therapeutic target." Nature **438**(7070): 967-974.
- Figini, M., A. Green, F. Colotta y S. Canevari (2003). "Isolation of human Fab fragments against ovarian carcinoma using guided selection." Methods Mol Biol **207**: 145-159.
- Fogal, V., L. Zhang, S. Krajewski y E. Ruoslahti (2008). "Mitochondrial/cell-surface protein p32/gC1qR as a molecular target in tumor cells and tumor stroma." Cancer Res **68**(17): 7210-7218.
- Foote, J. y H. N. Eisen (2000). "Breaking the affinity ceiling for antibodies and T cell receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 10679-10681.

- Francisco, J. A., R. Campbell, B. L. Iverson y G. Georgiou (1993). "Production and fluorescence-activated cell sorting of Escherichia coli expressing a functional antibody fragment on the external surface." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(22): 10444-10448.
- Fu, Y., L. N. Shearing, S. Haynes, P. Crewther, L. Tilley, R. F. Anders y M. Foley (1997). "Isolation from phage display libraries of single chain variable fragment antibodies that recognize conformational epitopes in the malaria vaccine candidate, apical membrane antigen-1." J Biol Chem **272**(41): 25678-25684.
- Gannon, P. O., J. Godin-Ethier, M. Hassler, N. Delvoye, M. Aversa, A. O. Poisson, B. Peant, M. Alam Fahmy, F. Saad, R. Lapointe y A. M. Mes-Masson (2010). "Androgen-regulated expression of arginase 1, arginase 2 and interleukin-8 in human prostate cancer." PLoS ONE **5**(8): e12107.
- Gaumet, M., A. Vargas, R. Gurny y F. Delie (2008). "Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters." Eur J Pharm Biopharm **69**(1): 1-9.
- Gennari, F., S. Mehta, Y. Wang, A. St Clair Tallarico, G. Palu y W. A. Marasco (2004). "Direct phage to intrabody screening (DPIS): demonstration by isolation of cytosolic intrabodies against the TES1 site of Epstein Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) that block NF-kappaB transactivation." J Mol Biol **335**(1): 193-207.
- Ghebrehiwet, B., B. L. Lim, E. I. Peerschke, A. C. Willis y K. B. Reid (1994). "Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular "heads" of C1q." J Exp Med **179**(6): 1809-1821.
- Gibson, T. (1984). Studies in the Epstein-Barr virus genome. MRC Laboratory of Molecular Biology. Cambridge, University of Cambridge. **BLDSC number: D58257/85. PhD.13471.**
- Griffiths, A. D., S. C. Williams, O. Hartley, I. M. Tomlinson, P. Waterhouse, W. L. Crosby, R. E. Kontermann, P. T. Jones, N. M. Low, T. J. Allison y et ál. (1994). "Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires." Embo J **13**(14): 3245-3260.

- Gupta, S., R. B. Batchu y K. Datta (1991). "Purification, partial characterization of rat kidney hyaluronic acid binding protein and its localization on the cell surface." Eur J Cell Biol **56**(1): 58-67.
- Hamzeh-Mivehroud, M., A. Mahmoudpour, H. Rezazadeh y S. Dastmalchi (2008). "Non-specific translocation of peptide-displaying bacteriophage particles across the gastrointestinal barrier." Eur J Pharm Biopharm **70**(2): 577-581.
- Hoogenboom, H. R., A. D. Griffiths, K. S. Johnson, D. J. Chiswell, P. Hudson y G. Winter (1991). "Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains." Nucleic Acids Res **19**(15): 4133-4137.
- Inokuchi, J., N. Narula, D. S. Yee, D. W. Skarecky, A. Lau, D. K. Ornstein y D. R. Tyson (2009). "Annexin A2 positively contributes to the malignant phenotype and secretion of IL-6 in DU145 prostate cancer cells." Int J Cancer **124**(1): 68-74.
- Jensen, K. B. y P. Kristensen (2005). "Isolation of recombinant phage-displayed antibodies recognizing skin keratinocytes." Methods Mol Biol **289**: 359-370.
- Karmali, P. P., V. R. Kotamraju, M. Kastantin, M. Black, D. Missirlis, M. Tirrell y E. Ruoslahti (2009). "Targeting of albumin-embedded paclitaxel nanoparticles to tumors." Nanomedicine **5**(1): 73-82.
- Kittlesen, D. J., K. A. Chianese-Bullock, Z. Q. Yao, T. J. Braciale y Y. S. Hahn (2000). "Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation." J Clin Invest **106**(10): 1239-1249.
- Kohler, G. y C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**(5517): 495-497.
- Krainer, A. R., A. Mayeda, D. Kozak y G. Binns (1991). "Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and Drosophila splicing regulators." Cell **66**(2): 383-394.
- Kristensen, P. y G. Winter (1998). "Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages." Fold Des **3**(5): 321-328.

- Krumpe, L. R. y T. Mori (2006). "The Use of Phage-Displayed Peptide Libraries to Develop Tumor-Targeting Drugs." Int J Pept Res Ther **12**(1): 79-91.
- Kuna, P., M. Iyer, E. I. Peerschke, A. P. Kaplan, K. B. Reid y B. Ghebrehiwet (1996). "Human C1q induces eosinophil migration." Clin Immunol Immunopathol **81**(1): 48-54.
- Laakkonen, P., M. E. Akerman, H. Biliran, M. Yang, F. Ferrer, T. Karpanen, R. M. Hoffman y E. Ruoslahti (2004). "Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(25): 9381-9386.
- Laakkonen, P., K. Porkka, J. A. Hoffman y E. Ruoslahti (2002). "A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels." Nat Med **8**(7): 751-755.
- Lee, S. M., E. J. Lee, H. Y. Hong, M. K. Kwon, T. H. Kwon, J. Y. Choi, R. W. Park, T. G. Kwon, E. S. Yoo, G. S. Yoon, I. S. Kim, E. Ruoslahti y B. H. Lee (2007). "Targeting bladder tumor cells in vivo and in the urine with a peptide identified by phage display." Mol Cancer Res **5**(1): 11-19.
- Mahdi, F., Z. S. Madar, C. D. Figueroa y A. H. Schmaier (2002). "Factor XII interacts with the multiprotein assembly of urokinase plasminogen activator receptor, gC1qR, and cytokeratin 1 on endothelial cell membranes." Blood **99**(10): 3585-3596.
- Mahdi, F., Z. Shariat-Madar, R. F. Todd, 3rd, C. D. Figueroa y A. H. Schmaier (2001). "Expression and colocalization of cytokeratin 1 and urokinase plasminogen activator receptor on endothelial cells." Blood **97**(8): 2342-2350.
- Makela, A. R., H. Matilainen, D. J. White, E. Ruoslahti y C. Oker-Blom (2006). "Enhanced baculovirus-mediated transduction of human cancer cells by tumor-homing peptides." J Virol **80**(13): 6603-6611.
- Mattheakis, L. C., R. R. Bhatt y W. J. Dower (1994). "An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(19): 9022-9026.

- Molek, P., B. Strukelj y T. Bratkovic (2011). "Peptide phage display as a tool for drug discovery: targeting membrane receptors." *Molecules* **16**(1): 857-887.
- Molenaar, T. J., I. Michon, S. A. de Haas, T. J. van Berkel, J. Kuiper y E. A. Biessen (2002). "Uptake and processing of modified bacteriophage M13 in mice: implications for phage display." *Virology* **293**(1): 182-191.
- Morris, C. F., M. S. Castro y W. Fontes (2008). "Neutrophil proteome: lessons from different standpoints." *Protein Pept Lett* **15**(9): 995-1001.
- Oh, P., Y. Li, J. Yu, E. Durr, K. M. Krasinska, L. A. Carver, J. E. Testa y J. E. Schnitzer (2004). "Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy." *Nature* **429**(6992): 629-635.
- Oiki, S. y Y. Okada (1988). "C1q induces chemotaxis and K⁺ conductance activation coupled to increased cytosolic Ca²⁺ in mouse fibroblasts." *J Immunol* **141**(9): 3177-3185.
- Olioni, S. M., M. J. Paul-Clark, H. C. Christian, R. J. Flower y M. Perretti (2001). "Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression." *Am J Pathol* **158**(2): 603-615.
- Orlandi, R., D. H. Gussow, P. T. Jones y G. Winter (1989). "Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(10): 3833-3837.
- Park, J. H., G. von Maltzahn, M. J. Xu, V. Fogal, V. R. Kotamraju, E. Ruoslahti, S. N. Bhatia y M. J. Sailor (2010). "Cooperative nanomaterial system to sensitize, target, and treat tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(3): 981-986.
- Pasqualini, R. y E. Ruoslahti (1996). "Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries." *Nature* **380**(6572): 364-366.
- Peerschke, E. I., K. B. Reid y B. Ghebrehiwet (1994). "Identification of a novel 33-kDa C1q-binding site on human blood platelets." *J Immunol* **152**(12): 5896-5901.
- Peerschke, E. I., S. S. Smyth, E. I. Teng, M. Dalzell y B. Ghebrehiwet (1996). "Human umbilical vein endothelial cells possess binding sites for the globular domain of C1q." *J Immunol* **157**(9): 4154-4158.

- Ponsel, D., J. Neugebauer, K. Ladetzki-Baehs y K. Tissot (2011). "High affinity, developability and functional size: the holy grail of combinatorial antibody library generation." Molecules **16**(5): 3675-3700.
- Qualls, J. E. y P. J. Murray (2011). "Tumor macrophages protective and pathogenic roles in cancer development." Curr Top Dev Biol **94**: 309-328.
- Raynal, P., P. M. van Bergen en Henegouwen, F. Hullin, J. M. Ragab-Thomas, J. Fauvel, A. Verkleij y H. Chap (1992). "Morphological and biochemical evidence for partial nuclear localization of annexin 1 in endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **186**(1): 432-439.
- Reth, M., T. Imanishi-Kari y K. Rajewsky (1979). "Analysis of the repertoire of anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP) antibodies in C 57 BL/6 mice by cell fusion. II. Characterization of idiotopes by monoclonal anti-idiotope antibodies." Eur J Immunol **9**(12): 1004-1013.
- Retter, I., H. H. Althaus, R. Munch y W. Muller (2005). "VBASE2, an integrative V gene database." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D671-674.
- Ruoslahti, E., S. N. Bhatia y M. J. Sailor (2010). "Targeting of drugs and nanoparticles to tumors." J Cell Biol **188**(6): 759-768.
- Sanz, L., P. Santos-Valle, V. Alonso-Camino, C. Salas, A. Serrano, J. L. Vicario, A. M. Cuesta, M. Compte, D. Sanchez-Martin y L. Alvarez-Vallina (2008). "Long-term in vivo imaging of human angiogenesis: critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels." Microvasc Res **75**(3): 308-314.
- Sastry, L., M. Alting-Mees, W. D. Huse, J. M. Short, J. A. Sorge, B. N. Hay, K. D. Janda, S. J. Benkovic y R. A. Lerner (1989). "Cloning of the immunological repertoire in Escherichia coli for generation of monoclonal catalytic antibodies: construction of a heavy chain variable region-specific cDNA library." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(15): 5728-5732.
- Skerra, A. y A. Pluckthun (1988). "Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli." Science **240**(4855): 1038-1041.

- Smith, G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." *Science* **228**(4705): 1315-1317.
- St Croix, B., C. Rago, V. Velculescu, G. Traverso, K. E. Romans, E. Montgomery, A. Lal, G. J. Riggins, C. Lengauer, B. Vogelstein y K. W. Kinzler (2000). "Genes expressed in human tumor endothelium." *Science* **289**(5482): 1197-1202.
- Steinberger, P., A. Szekeres, S. Wille, J. Stockl, N. Selenko, E. Prager, G. Staffler, O. Madic, H. Stockinger y W. Knapp (2002). "Identification of human CD93 as the phagocytic C1q receptor (C1qRp) by expression cloning." *J Leukoc Biol* **71**(1): 133-140.
- Sugahara, K. N., T. Teesalu, P. P. Karmali, V. R. Kotamraju, L. Agemy, D. R. Greenwald y E. Ruoslahti (2010). "Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs." *Science* **328**(5981): 1031-1035.
- Sun, Z., A. Almogren, P. B. Furtado, B. Chowdhury, M. A. Kerr y S. J. Perkins (2005). "Semi-extended solution structure of human myeloma immunoglobulin D determined by constrained X-ray scattering." *J Mol Biol* **353**(1): 155-173.
- Sundaram, S. y D. Yarmush (1999). Monoclonal Antibodies and Their Engineered Fragmen. *The Biomedical Engineering Handbook, Second Edition. 2 Volume Set*, CRC Press.
- Tanaka, M. M., S. A. Sisson y G. C. King (2009). "High affinity extremes in combinatorial libraries and repertoires." *J Theor Biol* **261**(2): 260-265.
- Teesalu, T., K. N. Sugahara, V. R. Kotamraju y E. Ruoslahti (2009). "C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(38): 16157-16162.
- Tomlinson, I. M., G. Walter, J. D. Marks, M. B. Llewelyn y G. Winter (1992). "The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops." *J Mol Biol* **227**(3): 776-798.
- Uhlen, M., P. Oksvold, L. Fagerberg, E. Lundberg, K. Jonasson, M. Forsberg, M. Zwahlen, C. Kampf, K. Wester, S. Hober, H. Wernerus, L. Bjorling y F. Ponten (2010). "Towards a knowledge-based Human Protein Atlas." *Nat Biotechnol* **28**(12): 1248-1250.

- Vegh, Z., E. C. Goyarts, K. Rozengarten, A. Mazumder y B. Ghebrehiwet (2003). "Maturation-dependent expression of C1q-binding proteins on the cell surface of human monocyte-derived dendritic cells." *Int Immunopharmacol* **3**(3): 345-357.
- Veleva, A. N., D. B. Nepal, C. B. Frederick, J. Schwab, P. Lockyer, H. Yuan, D. S. Lalush y C. Patterson (2011). "Efficient in vivo selection of a novel tumor-associated peptide from a phage display library." *Molecules* **16**(1): 900-914.
- von Maltzahn, G., Y. Ren, J.-H. Park, D.-H. Min, V. R. Kotamraju, J. Jayakumar, V. Fogal, M. J. Sailor, E. Ruoslahti y S. N. Bhatia (2008). "In Vivo Tumor Cell Targeting with Click Nanoparticles." *Bioconjugate Chem.*
- Wang, X. P., J. H. Zhang, Y. J. Wang, Y. Feng, X. Zhang, X. X. Sun, J. L. Li, X. T. Du, M. P. Lambert, S. G. Yang, M. Zhao, W. L. Klein y R. T. Liu (2009). "Conformation-dependent single-chain variable fragment antibodies specifically recognize beta-amyloid oligomers." *FEBS Lett* **583**(3): 579-584.
- Waterhouse, A. M., J. B. Procter, D. M. Martin, M. Clamp y G. J. Barton (2009). "Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench." *Bioinformatics* **25**(9): 1189-1191.
- Yip, Y. L., N. J. Hawkins, G. Smith y R. L. Ward (1999). "Biodistribution of filamentous phage-Fab in nude mice." *J Immunol Methods* **225**(1-2): 171-178.
- Yu, L., P. M. Loewenstein, Z. Zhang y M. Green (1995). "In vitro interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Tat transactivator and the general transcription factor TFIIB with the cellular protein TAP." *J Virol* **69**(5): 3017-3023.
- Zebedee, S. L., C. F. Barbas, 3rd, Y. L. Hom, R. H. Caothien, R. Graff, J. DeGraw, J. Pyati, R. LaPolla, D. R. Burton, R. A. Lerner y et ál. (1992). "Human combinatorial antibody libraries to hepatitis B surface antigen." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(8): 3175-3179.
- Zhang, L., E. Giraudo, J. A. Hoffman, D. Hanahan y E. Ruoslahti (2006). "Lymphatic zip codes in premalignant lesions and tumors." *Cancer Res* **66**(11): 5696-5706.
- Zhang, Q., G. Chen, X. Liu y Q. Qian (2007). "Monoclonal antibodies as therapeutic agents in oncology and antibody gene therapy." *Cell Res* **17**(2): 89-99.

- Zou, J., M. T. Dickerson, N. K. Owen, L. A. Landon y S. L. Deutscher (2004).
“Biodistribution of filamentous phage peptide libraries in mice.” Mol Biol Rep
31(2): 121-129.

APÉNDICE

El trabajo desarrollado en este período de investigación ha generado una serie de resultados que han sido recogidos en publicaciones y patentes cuyas referencias aparecen aquí indicadas. Se incluye, a continuación, un artículo directamente relacionado con esta Tesis Doctoral.

Artículos publicados:

- Alonso-Camino, V., **D. Sanchez-Martin**, M. Compte, L. Sanz y L. Alvarez-Vallina (2009). "Lymphocyte display: a novel antibody selection platform based on T cell activation." *PLoS One* **4**(9): e7174.
- Compte, M., V. Alonso-Camino, P. Santos-Valle, A. M. Cuesta, **D. Sanchez-Martin**, M. R. Lopez, J. L. Vicario, C. Salas, L. Sanz y L. Alvarez-Vallina (2010). "Factory neovessels: engineered human blood vessels secreting therapeutic proteins as a new drug delivery system." *Gene Ther* **17**(6): 745-751.
- Compte, M., A. M. Cuesta, **D. Sanchez-Martin**, V. Alonso-Camino, J. L. Vicario, L. Sanz y L. Alvarez-Vallina (2009). "Tumor immunotherapy using gene-modified human mesenchymal stem cells loaded into synthetic extracellular matrix scaffolds." *Stem Cells* **27**(3): 753-760.
- Cuesta, A. M., **D. Sanchez-Martin**, L. Sanz y L. Alvarez-Vallina (2008). "Comment on "Production of multivalent protein binders using a self-trimerization collagen-like peptide scaffold"." *Faseb J* **22**(10): 3417; author reply 3417-3418.
- Cuesta, A. M., **D. Sanchez-Martin**, L. Sanz, J. Bonet, M. Compte, L. Kremer, F. J. Blanco, B. Oliva y L. Alvarez-Vallina (2009). "In vivo tumor targeting and imaging with engineered trivalent antibody fragments containing collagen-derived sequences." *PLoS ONE* **4**(4): e5381.
- Sanz, L., P. Santos-Valle, V. Alonso-Camino, C. Salas, A. Serrano, J. L. Vicario, A. M. Cuesta, M. Compte, **D. Sanchez-Martin** y L. Alvarez-Vallina (2008). "Long-term in vivo imaging of human angiogenesis: critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels." *Microvasc Res* **75**(3): 308-314.
- Sanchez-Martin, D.**, A. M. Cuesta, V. Fogal, E. Ruoslahti y L. Alvarez-Vallina (2011). "The Multicompartmental p32/gClqR as a New Target for Antibody-based Tumor Targeting Strategies." *J Biol Chem* **286**(7): 5197-5203.
- Sanchez-Martin, D.**, L. Sanz y L. Alvarez-Vallina (2011). "Engineering human cells for in vivo secretion of antibody and non-antibody therapeutic proteins." *Curr Opin Biotechnol* **En prensa**, DOI: 10.1016/j.copbio.2011.03.001.

Patentes:

Título: PLATAFORMA DE SELECCIÓN DE REPERTORIOS DE ANTICUERPOS BASADA EN LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T

Número de solicitud: P200901826

Fecha de presentación: 04.09.2009

Solicitante: Universidad Autónoma de Madrid

Inventores: Alonso Camino, Vanesa; **Sánchez Martín, David**; Bonilla Velasco, Félix; Álvarez Vallina, Luis.

Título: PROTEÍNAS OLIGOMÉRICAS Y SUS APLICACIONES.

Número de solicitud: PCT/ES2009070107

Fecha de presentación: 20.04.09

Solicitante: Universidad Autónoma de Madrid

Inventores: Cuesta Martínez, Ángel; **Sánchez Martín, David**; Sanz Alcober, Laura; Compte Grau, Marta; Bonilla Velasco, Félix; Álvarez Vallina, Luis.

Título: MODELO ANIMAL DE ANGIOGÉNESIS HUMANA Y SUS APLICACIONES

Número de solicitud: PCT/ES2009/070452

Fecha de presentación: 22.10.2008

Solicitante: Universidad Autónoma de Madrid

Inventores: Sanz Alcober, Laura; Compte Grau, Marta; Alonso Camino, Vanesa; Cuesta Martínez, Ángel; **Sánchez Martín, David**; Santos Valle, Patricia; Álvarez Vallina, Luis; Bonilla Velasco, Félix.



The Multicompartmental p32/gC1qR as a New Target for Antibody-based Tumor Targeting Strategies^{*[S]}

Received for publication, July 7, 2010, and in revised form, November 30, 2010. Published, JBC Papers in Press, December 14, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.161927

David Sánchez-Martín^{†1}, Ángel M. Cuesta[‡], Valentina Fogal^{§2}, Erkki Ruoslahti^{§¶}, and Luis Álvarez-Vallina^{‡3}

From the [†]Molecular Immunology Unit, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, 28222 Madrid, Spain, the [§]Cancer Research Center, Sanford-Burnham Medical Research Institute, La Jolla, California 92037, and the [¶]Vascular Mapping Center, Sanford-Burnham Medical Research Institute, University of California Santa Barbara, Santa Barbara, California 93106-9610

Tumor-associated cell surface antigens and tumor-associated vascular markers have been used as a target for cancer intervention strategies. However, both types of targets have limitations due to accessibility, low and/or heterogeneous expression, and presence of tumor-associated serum antigen. It has been previously reported that a mitochondrial/cell surface protein, p32/gC1qR, is the receptor for a tumor-homing peptide, LyP-1, which specifically recognizes an epitope in tumor cells, tumor lymphatics, and tumor-associated macrophages/myeloid cells. Using antibody phage technology, we have generated an anti-p32 human monoclonal antibody (2.15). The 2.15 antibody, expressed in single-chain fragment variable and in trimerbody format, was then characterized *in vivo* using mice grafted subcutaneously with MDA-MB-231 human breast cancers cells, revealing a highly selective tumor uptake. The intratumoral distribution of the antibody was consistent with the expression pattern of p32 in the surface of some clusters of cells. These results demonstrate the potential of p32 for antibody-based tumor targeting strategies and the utility of the 2.15 antibody as targeting moiety for the selective delivery of imaging and therapeutic agents to tumors.

The localization of tumors may be accomplished by any of several combinations including computed tomography, ultrasonography, gamma camera examination, and glucose consumption (1, 2). However, targeted localization of the tumors is preferred, mainly using specific probes that bind to tumor-associated cell surface antigens or to markers of angiogenesis expressed by endothelial cells or present in the surrounding extracellular matrix (3–6). Probes that bind to tumor-associated cell surface antigens have some drawbacks (7) such as the heterogeneous expression on the cell surface or the increased serum levels of the antigen as tumors grow, which may act as

a trap for the targeting agent. Angiogenesis related targets are readily accessible; however, the relatively low abundance of endothelial cells in tumor tissue makes the molecular imaging of tumor neovessels more challenging. Furthermore, angiogenesis may occur also in a physiological context, thus adding more complexity to the targeting.

With these limitations in mind, we hypothesized as an alternative target a marker selectively expressed in different compartments in the tumor area. One targeting agent specific for the tumor but not restricted to the tumor cells is the tumor homing peptide (LyP-1), which strongly and specifically accumulates in the tumor after systemic administration, localizing preferentially associated to lymphatic markers (8–10). LyP-1-binding protein was characterized as p32 (10), a multi-ligand and multicompartmental protein that has been independently identified in several contexts and has been named accordingly as SF2P32 (splicing factor SF2-associated protein; 11), HABP-1 (hyaluronic acid binding protein-1; 12), gC1qR (globular domain of C1q receptor; Ref. 13), or HIV TAP (Tat-associated protein; 14). Although p32 is primarily present in the mitochondria, it has been, under certain conditions (15), detected in different cellular compartments (nucleus, cellular surface, endoplasmic reticulum (13, 16–20)) and in different cell types (B lymphocyte (13)), platelets (21), neutrophils (22), eosinophils (23), endothelial cells (24), macrophages and dendritic cells (25, 26), or fibroblasts (27)). p32 has also been recently reported in the surface of tumor cells in hypoxic/nutrient-deprived areas as well as in the cell surface of a tumor-associated macrophage/myeloid cell subpopulation closely linked to tumor lymphatics (10).

In this work, we take advantage of the over-expression of the multicompartmental p32/gC1qR (hereafter referred to as p32) associated to tumors (in tumor cells, tumor lymphatics, and tumor-associated macrophages) to generate a human anti-p32 single-chain Fv (scFv)⁴ antibody (2.15). This antibody has shown to selectively target solid tumors *in vivo* both as a monovalent and trivalent antibody fragment.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cells and Culture Conditions—All cells were from the ATCC. HEK-293 cells (human embryonic kidney epithelia; CRL-1573), and MDA-MB-231 (human breast adenocarcinoma; HTB-26) were grown in DMEM supplemented with

^{*} This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (BIO2008-03233), the Comunidad Autónoma de Madrid (S-BIO-0236-2006), the European Union (SUOE-FEDER (IMMUNONET-SOE1/P1/E014; to L. A.-V.), and a grant from the U. S. Department of Defense Breast Cancer Program (to E. R.).

^[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. 1 and 2.

¹ Supported by Comunidad Autónoma de Madrid/Fondo Social Europeo Training Grant FPI-000531.

² Supported a fellowship from the Susan Komen Foundation.

³ To whom correspondence should be addressed: Unidad de Inmunología Molecular, Hospital Universitario Puerta de Hierro, C/Manuel de Falla 1, 28222 Majadahonda, Madrid, Spain. Tel.: 34-911916764; Fax: 34-913160644; E-mail: lalvarezv.hpth@salud.madrid.org.

⁴ The abbreviations used are: scFv, single-chain fragment variable; NIP, 4-hydroxy-5-iodo-3-nitrophenyl; rhp32, recombinant human p32.

10% heat-inactivated FCS (all from Invitrogen) in humidified CO₂ (5%) incubator at 37 °C. U-937 cells (human histiocytic lymphoma; CRL-1593.2) and 4T1 cells (mouse breast tumor; CRL-2539) were maintained in RPMI supplemented with 10% FCS. Differentiation of the U-937 cells was induced for the indicated time intervals in fresh culture medium containing 5 nM phorbol myristic acid (Sigma-Aldrich).

Recombinant Proteins, Antibodies, Peptides, and Reactives—Recombinant human p32 (rhp32) was obtained from bacteria and purified by immobilized metal ion affinity chromatography. Recombinant mouse p32 was purchased from United States Biological (USBio). Purified rabbit polyclonal anti-full-length p32 was directed against the N terminus (amino acids 76–93). The mAbs used included mouse anti-p32 (60.11 and 74.5.2), anti-human c-Myc 9.E10, FITC-conjugated anti-human c-Myc 9.E10 (Abcam, Cambridge, UK); anti-human MHC class I molecules W6/32 (eBioscience, San Diego, CA); rat anti-mouse CD31 (BD Biosciences); HRP-conjugated anti-human c-Myc (Invitrogen); and HRP-conjugated anti-M13 bacteriophage (GE Healthcare). The polyclonal antibodies used included an Alexa Fluor 546-conjugated anti-rat IgG (Invitrogen); a phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK); an HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG; and an HRP-conjugated sheep anti-mouse IgG (GE Healthcare). Trypsin, BSA, *o*-phenylenediamine dihydrochloride, and isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside were from Sigma-Aldrich. BSA was conjugated with 4-hydroxy-5-iodo-3-nitrophenyl (NIP; Sigma-Aldrich) in a molar ratio of 10:1 (NIP10-BSA) as described (28). Mouse EHS-laminin (LM111) was from (BD Biosciences).

Selection of scFv Phage Library on rhp32—Recombinant scFv phages (Griffin.1 library, Medical Research Council Cambridge; total diversity, $\sim 1.2 \times 10^9$) (29) were panned for binding on purified antigen (rhp32) as described (30) with slight modifications: immunotubes (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight at 4 °C with 4 ml of rhp32 at a concentration of 10 µg/ml in PBS. After washing twice with PBS, the tubes were blocked for 2 h at 37 °C with 4% BSA in PBS. Meanwhile, 10¹³ phages were blocked with 1 ml 4% BSA in PBS. Preblocked phages were added to the immunotube and incubated at room temperature with continuous rotation for 30 min, followed by 90 min of stationary incubation. The tubes were washed 10 times (in the first round of selection, 20 in the subsequent selections) with PBS containing 0.05% Tween 20 and then with PBS. Bound phages were eluted with 1 ml of trypsin (1 mg/ml in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM CaCl₂) at room temperature with continuous rotation for 20 min. Eluted phages were recovered by infecting logarithmically growing (*A*₆₀₀ = 0.5) *Escherichia coli* TG1 (K12, Δ(*lac-pro*), *supE*, *thi*, *hsdD5/F' traD36*, *proA*⁺*B*⁺, *lacI*^q, *lacZ*ΔM15 (31)) at 37 °C for 30 min. The infected cells were plated on LB agar supplemented with 100 µg/ml ampicillin and 1% glucose and incubated overnight at 37 °C. This enriched library was grown on *E. coli* TG1 and rescued upon infection with the helper phage KM13 (32). Phages displaying scFv fragments were purified from the culture supernatant by precipitation with 20% PEG 6000 and 2.5 M NaCl and were

resuspended in sterile cold PBS with 15% glycerol for long term storage at –80 °C and for subsequent rounds of selection.

Screening of Selected Phages by ELISA—Single colonies were screened by ELISA to evaluate the frequency of phage displaying rhp32-binding scFv fragments as described (33). rhp32-binding phages were fingerprinted by amplifying the scFv using primers LMB3 and FdSeq1 (LMB3, 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'; FdSeq1, 5'-GAA TTT TCT GTA TGA GG-3') followed by digestion with the frequent cutting enzyme BstN-I (New England Biolabs). Molecular characterization was completed by sequencing the variable regions using primers FOR_LinkSeq (V_H; 5'-GCC ACC TCC GCC TGA ACC-3') and pHEN_Seq (V_L; 5'-CTA TGC GGC CCC ATT CA-3'). Sequences were analyzed and aligned to the VBASE2 database (34) to learn the amino acids forming the loops in the complementarity-determining regions used and type of chains present.

Soluble Antibody Expression and Purification—Phage particles from selected clones were used to infect logarithmically growing (*A*₆₀₀ = 0.5) *E. coli* HB2151 (nonsuppressor strain (K12, *ara*, Δ(*lac-pro*), *thi*/F' *proA*⁺*B*⁺, *lacI*^qΔM15 (35)), and soluble scFv fragments were obtained as described (33). Purification was performed using the ÄKTApurifier plus system (affinity step: HisTrap or HiTrap rProtein A FF columns (GE Healthcare) according to the manufacturer's protocol followed by gel filtration HiPrep 16/60 Sephacryl S100-HR) and checked by ELISA and SDS-PAGE. Either supernatant from isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside-induced HB2151 or purified scFv was used. Competition ELISA was performed as a standard ELISA but with a previous step of blockade using mAb; after blocking with 300 µl 4% BSA in PBS at 37 °C for 1 h, wells were incubated with 100 µl of a 20 µg/ml solution of the appropriate reagent (mAb 60.11, mAb 74.5.2, or control mouse IgG1) for 1 h at room temperature and 30 rpm.

Flow Cytometry—To study the ability of the scFv to detect p32 on the cell surface, unstimulated mouse 4T1 cells and phorbol myristic acid-stimulated human U-937 cells (5 nM for 3, 6, or 12 h prior to the staining) were incubated with anti-p32 mAb (5 µg/ml) or purified scFv (10 µg/ml) and mAb 9E10 (4 µg/ml) in 100 µl for 45 min. After washing, the cells were treated with appropriate dilutions of phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse IgG. The samples were analyzed with an EPICS XL (Coulter Electronics, Hialeah, FL).

Construction of Expression Vectors and Purification of Recombinant Multivalent Antibodies—The coding sequence of the scFv 2.15 was amplified using primers ClaI-2.15 (5'-TCA TCG ATG GAG GTG CAG CTG GTG GAG-3') and FdSeq1 and ligated into pCR2.1 TOPO. The ClaI/NotI-digested fragment was ligated into the ClaI/NotI pCR3.1-L36-NC1^{ES-}-digested plasmid (6) to obtain the pCR3.1-2.15-NC1^{ES-} plasmid. All constructs were verified by sequencing. The details about the plasmid pCEP4-B1.8-NC1^{ES-} containing the B1.8 (anti-NIP) trimerbody and the procedure to obtain purified trimerbodies can be found elsewhere (6).

Antibody Labeling with Cyanine 5—Purified antibodies (scFvs and trimerbodies) were labeled with the near-infrared cyanine 5 (Cy5) *N*-hydroxysuccinimide (NHS) esters (GE

Healthcare) according to the manufacturer's recommendations. One milliliter of the antibody solution (1 mg/ml) was conjugated with 0.1 ml of a 2 mg/ml Cy5 solution for 1 h in the dark at room temperature. Cy5-labeled recombinant antibodies were separated from unconjugated Cy5 dye by gel filtration on Sephadex G-25 Superfine HiTrap Desalting columns (PD-10 columns, GE Healthcare), and concentrated in 10,000 molecular weight cutoff (MWCO) Vivaspinn 500 filter (Vivascience) to 1 mg/ml. The labeling ratio of Cy5 to antibody (Cy5:antibody) was calculated as described (36) and was close to 1:(1–2). The functionality of Cy5-labeled antibodies was verified by ELISA against specific antigen.

Infrared Immunophotodetection in Tumor-bearing Mice—Imaging was performed as described (6) with slight modifications. Briefly, wild-type MDA-MB-231 cells (2×10^6) were implanted into the mammary fat pad of 6-week-old female Hsd:athymic nude-*Foxn1*tm mice (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain) maintained with a low manganese diet (ssniff Spezialdiäten GMBH, Soest, Germany). Nodule dimensions were used to calculate tumor volume using the formula: width² \times length \times 0.52. When tumors reached a volume of 0.2–0.4 cm³, mice were injected in the tail vein with 100 μ l Cy5-labeled antibody solution in PBS. Mice were imaged using the high resolution charge-coupled device cooled digital camera ORCA-2BT and Hokawo software (Hamamatsu Photonics France, Massy, France) under anesthesia. Three images were acquired for each experiment: a bright field image, a Cy5-specific image (emission, red light filter centered at 632.8 nm; optical filter, 665–680 nm), and an autofluorescence reference image (emission, blue light filtered at 470 nm; optical filter, 665–680 nm). Normalized reference autofluorescence was subtracted from the Cy5-specific image, and the resultant was tinted and merged with the bright-field image (tinted in the GFP blue-shifted spectral (448 nm) for better contrast) using the Hokawo software. Further editing included only cropping, resizing, and rotating the image for a better view of the picture. All mice were handled in accordance with the guidelines of the Hospital Universitario Puerta de Hierro Animal Care and Use Committee and performed in accordance with Spanish legislation.

Immunohistology—Tumors were removed after infrared imaging (2.5 h after i.v. injection), frozen in optimal cutting temperature (OCT) embedding medium (Sakura Tissue Tek, Alphen aan den Rijn, The Netherlands), and sectioned (4–7- μ m thickness) using the Leica CM1850 cryostat. Sections were incubated overnight with the primary antibodies (anti-Myc:FITC antibody (1:200) and rat anti-mouse CD31 (1:100)), followed by anti-rat secondary reagents (1:1000), and mounted by using VectaShield mounting media with 4',6-diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Images were acquired using a confocal scanning inverted Leica AOBSP2-microscope (Leica Microsystems).

RESULTS

Isolation of Human Anti-rhp32 Antibodies by Panning a scFv Library—The Griffin.1 library was panned against affinity purified recombinant human p32 (rhp32) immobilized in Nunc immunotubes. The frequency of binding clones was

studied by ELISA after each round of selection. The percentage of binders was 20% after the first round and 60% after the second. BstN1 fingerprinting of 24 selected clones (by rhp32/BSA ratio (in preliminary 96-well ELISA) > 3) indicated 16 different restriction patterns, which were later confirmed by DNA sequencing.

Biochemical Characterization of scFv Fragments—Ten different clones that were consistent binders were used in a phage-ELISA assay against rhp32 and other unrelated proteins (Fig. 1A). Most of the clones were highly specific for rhp32, showing almost no reactivity against other elements present in the selection process (plastic and BSA) or an unrelated protein (LM111). After expression as soluble scFv, although different from clone to clone, there was a significant reactivity of most of the scFvs against rhp32 (Fig. 1B). The binding of LyP-1 phage to p32 is inhibited by monoclonal antibody 60.11, which is directed against the C1q binding domain of p32 (10). To identify scFv sharing the epitope with mAb 60.11, four scFv fragments (1.6, 2.9, 2.15, and 2.25) were expressed using the nonsuppressor host *E. coli* HB2151 and purified from the supernatant by standard affinity chromatography procedures. The purified scFv fragments gave rise to a single protein band of expected mobility (Fig. 1C, inset); a competition ELISA was designed using either mAb 60.11 directed against p32 N-terminal amino acids 76–93 or 74.5.2 directed against amino acids 204–218 from the C terminus of p32. Preincubation with 60.11 but not 74.5.2 greatly diminished the binding of scFv 2.9 and 2.15, indicating overlapping, if not identical, epitopes (Fig. 1C). Due to the degree of cross-species conservation between rodents and humans, both in sequence and in the ability to bind C1q (37), we further investigated whether the selected scFv fragments were able to bind immobilized purified recombinant mouse p32. It was found that 2.9 gave no signal on recombinant mouse p32, whereas 2.15 gave comparable signals on both mouse and human p32 immobilized on plastic (Fig. 1D).

Reactivity of scFv Fragments to Cell Surface-expressed p32—The ability of the scFv fragments to recognize cell surface-expressed p32 was assessed by flow cytometry using freshly purified soluble scFv. Nonstimulated human U-937 cells reacted minimally with either anti-p32 mAbs (60.11 or 74.5.2) or scFv (2.9 or 2.15) (data not shown). In contrast, U-937 activation with phorbol myristic acid produced a consistently increased p32 expression as reflected by mAbs and scFv fragments. Staining with mAb 60.11 showed that ~50% of stimulated U-937 cells expressed p32 in the surface (Fig. 2A). Purified scFv fragments corresponding to 2.9 and 2.15, also stained the U-937 cells, and a slightly higher percentage of the cells were stained than with the 60.11 antibody (Fig. 2A). Surface staining of mouse 4T1 cells demonstrated the presence of p32 on the cell surface, in agreement with previous studies (10). The mAb 60.11 produced a small but consistent shift in flow cytometry analysis of live 4T1 cells (Fig. 2B). A similar staining pattern was observed in 4T1 cells incubated with the 2.15 scFv. In contrast, incubation of 4T1 cells with 2.9 scFv revealed no staining (Fig. 2B). Thus, further corroborating the ability of 2.15 to detect the mouse cell surface p32 to a extent similar to the mAb 60.11.

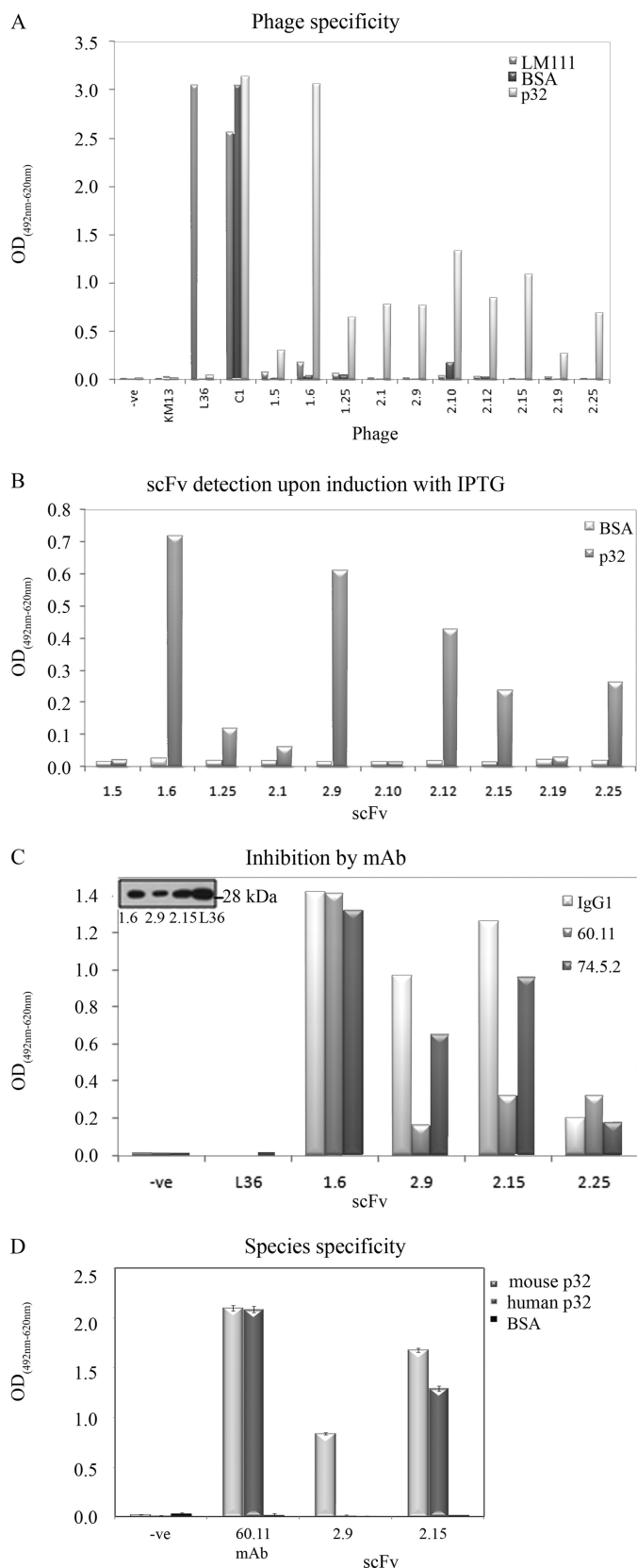


FIGURE 1. Characterization of anti-p32 phage-derived scFvs. A, specificity of phage scFv fragments from selected clones by ELISA. Reactivity was assessed against the following: elements present in the selection process (BSA); murine laminin-1 (LM111); and the target protein rhp32 (p32). Internal controls were as follows; L36 binds to LM111, but not other proteins; KM13, empty phage, does not bind any protein, whereas C1-phage binds

Tumor Targeting with Mono- and Trivalent Anti-p32 Antibodies—We selected the scFv 2.15 for *in vivo* targeting assays based on its inhibition by the 60.11 mAb as shown by ELISA on its ability to detect p32 expressed in the surface of both human and mouse cells as shown by flow cytometry. Control scFv antibodies included the following: B1.8 (anti-hapten NIP) and L36 (recognizes a conformational epitope of LM111 exposed in several solid tumor models (6)). Antibodies were labeled with the near-infrared fluorochrome Cy5 and injected in the tail vein of nude mice bearing MDA-MB-231 human xenografts. All of the antibodies showed a rapid renal clearance after i.v. injection, with peak signal intensity at 1–2 h and no detectable bladder signal at 24 h post-injection (Fig. 3B). The control scFv-B1.8 showed no detectable localization, whereas both 2.15 and L36 localized in the tumors (Fig. 3A). Maximum resolution was achieved at ~2h (Fig. 3A), when the ratio of the signal of the 2.15 and that of the B1.8 was near 7 (supplemental Fig. 1). *Ex vivo* imaging of the organs further confirms the specific accumulation of 2.15 and L36 in the tumors, while showing a similar uptake by the kidneys for all the antibodies (Fig. 3C). Staining of the tumors from mice that received the scFvs with FITC-conjugated anti-Myc mAb (to detect the injected scFv) and anti-CD31 mAb showed that most of the endothelial cells were negative for the scFv, and most of the scFv staining was dispersed in clusters of cells (Fig. 4, *white arrow*). However, some of the main vessels showed a distinct co-staining in the basal side of the cells (Fig. 4, *arrowhead*).

We have previously reported that the trimerbody format offers advantages over scFv molecules for tumor-targeting applications *in vivo* against a cell surface antigen or an extracellular matrix antigen (LM111) (6). We hypothesized that an anti-p32 trimerbody would also surpass its scFv counterpart for *in vivo* imaging. For this reason, the 2.15 scFv was assembled in the trimerbody format and expressed as a soluble secreted protein in human HEK-293 cells and purified from conditioned medium. The purification scheme yielded antibodies that were >95% pure by SDS-PAGE. The functionality of purified 2.15 trimerbody was demonstrated by ELISA against rhp32 (supplemental Fig. 2). Trimerbodies (2.15 and B1.8) were labeled with Cy5 and injected in the tail vein of nude mice bearing MDA-MB-231 human xenografts. Trimerbodies showed slower clearance than the corresponding scFvs (Fig. 5B). The control B1.8 trimerbody showed no detectable localization in the tumor, whereas a strong and selective accumulation was observed in the case of the 2.15 trimerbody. Maximum tumor uptake was detected at 2.5 and 5 h; the signal intensity decreased at 24 h although remained detectable for at least 48 h (Fig. 5A), whereas most of the systemic protein was eliminated at 24h (Fig. 5B).

BSA). Phage input was essentially the same for each clone and each ELISA as assessed by phage-ELISA. The y axis represents $A_{492\text{ nm}}$ corrected with $A_{620\text{ nm}}$ except otherwise stated. B, soluble scFv fragments retained their specificity after cloning in HB2151 and expression after induction with isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). C, monoclonal antibody competition analyses for p32 binding. Binding of 2.9 and 2.15 to rhp32 was diminished after incubation with mAb 60.11, suggesting a common epitope for the scFv and mAb. *Inset*, Western blotting of the purified scFv. D, 2.15, but not 2.9, was able to bind to human and mouse p32. Error bars represent the standard error of the mean of three different experiments.

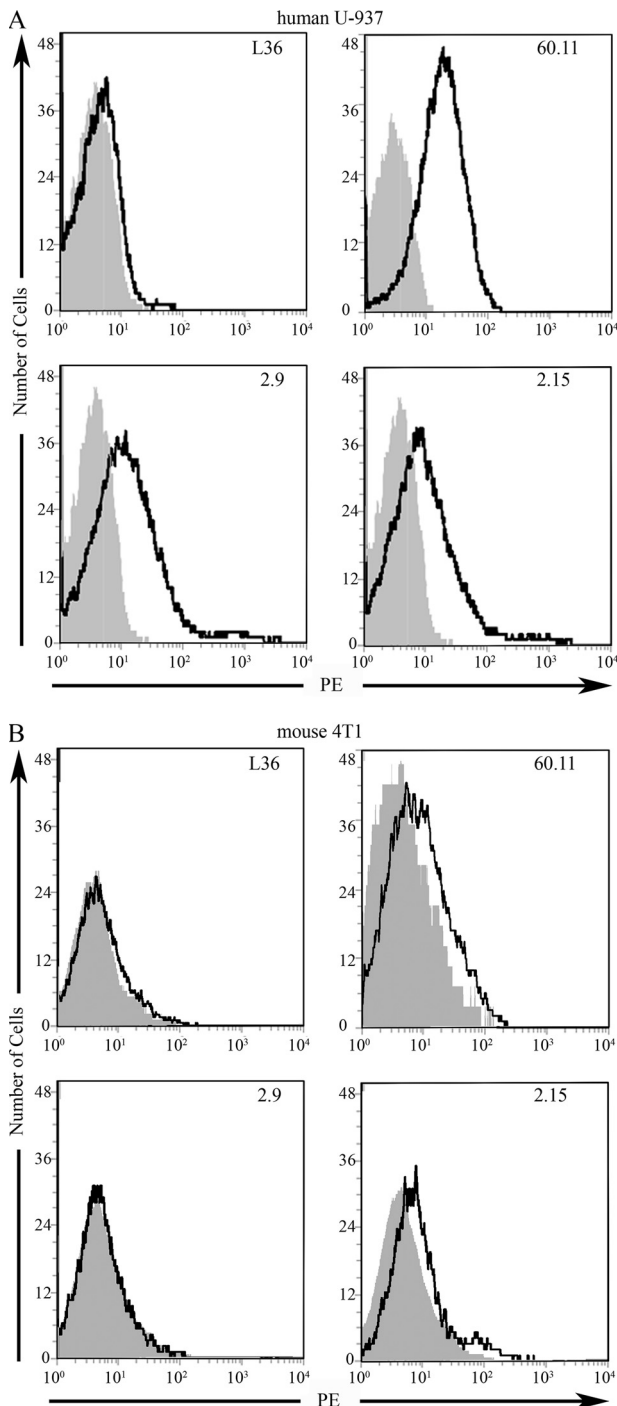


FIGURE 2. Reactivity of scFv fragments to cell surface expressed p32. A, binding of anti-p32 mAb and purified scFv fragments to phorbol myristic acid-stimulated human U-937 cells by flow cytometry. B, binding of anti-p32 mAb and purified scFv fragments to mouse 4T1 cells by flow cytometry. For purified scFv fragments, the bound scFv was detected with sequential incubations with 9E10 anti-Myc mAb and phycoerythrin (PE)-labeled goat anti-mouse IgG. FACSscan histograms show the binding of each scFv clone (bold line) and the backgrounds of phycoerythrin-conjugated secondary antibodies (gray).

DISCUSSION

We have generated a human recombinant antibody against the multicompartmental protein p32/gClqR. We have demonstrated the ability of different formats of this antibody (scFv and trimerbody) to target solid tumors *in vivo*. These results

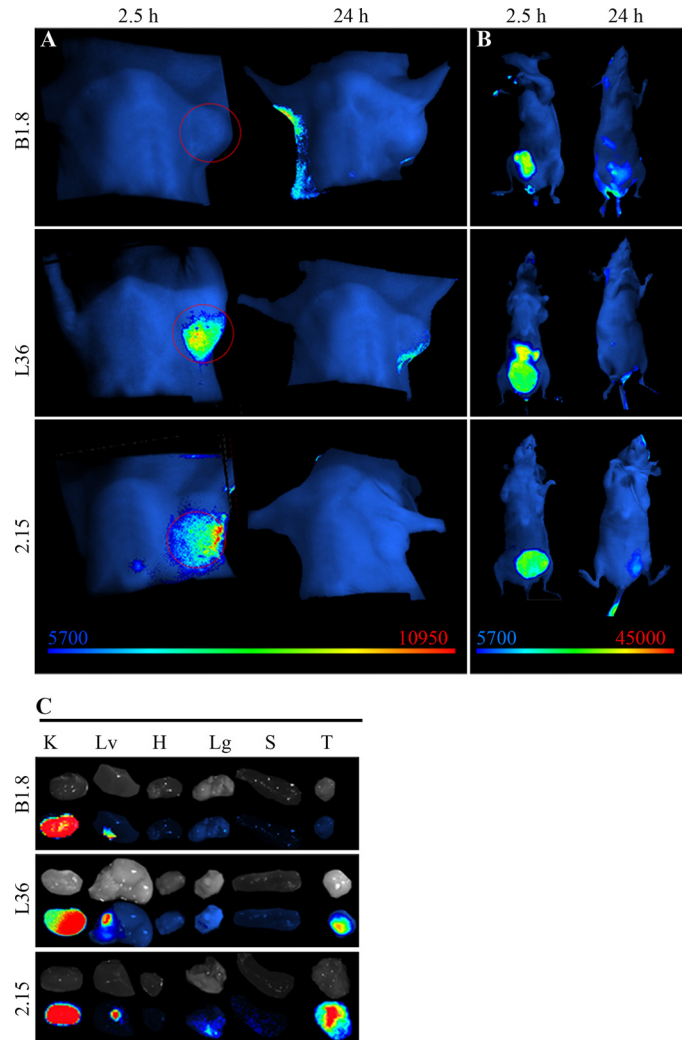


FIGURE 3. Targeting of fluorescently labeled anti-p32 scFv to human tumors. Near-infrared fluorescence imaging of nude mice bearing MDA-MB-231 human breast tumor xenografts. A, anti-hapten B1.8 did not localize in the tumor, whereas L36 and 2.15 showed a specific signal. A representative image of four mice is shown (2.15 scFv) and three mice (B1.8 and L36). B, ventral view shows similar accumulation of the scFv in the bladder. C, *ex vivo* imaging of the organs (kidney (K), liver (Lv), heart (H), lung (Lg), spleen (S), and tumor (T)) shows similar uptake of the Cy5-labeled reagent in the kidneys.

represent a new concept in tumor targeting. So far, antibody-based tumor targeting strategies have been based on tumor-associated cell surface antigens or tumor-associated vascular markers. Antibodies specific to tumor surface antigens, such as HER2-neu (38), carcinoembryonic antigen (39), or prostate-specific antigen (40), among others, have proven useful for *in vivo* localization of solid tumors. However, tumor surface antigens exhibit a high shedding profile and are dependent on tumor dedifferentiation or clonal proliferation. Antigens that are preferentially expressed in the tumor extracellular matrix may be better suited for tumor-targeting applications. In fact, several groups have demonstrated that antibodies specific to components of the extracellular matrix (EDB domain of fibronectin (41), domain C of tenascin C (42), and laminin (6, 33)) were capable of selective targeting of neo-vascular structures in solid tumors. However, it has been shown that antibodies against tumor-associated vascular

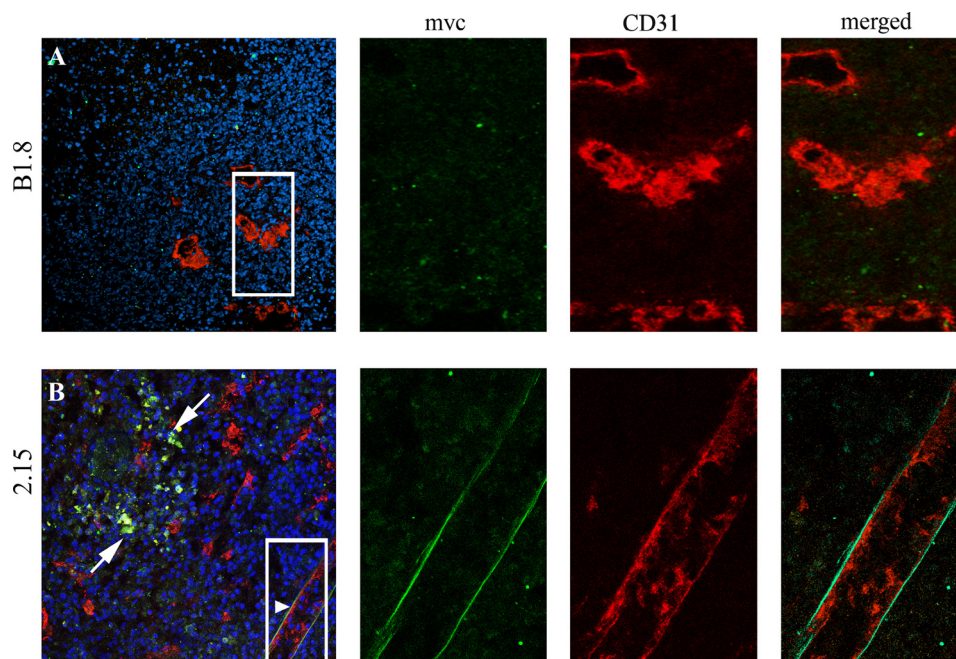


FIGURE 4. 2.15 scFv recognizes dispersed clusters of cells and the basal side of endothelial cells. After i.v. administration of the scFv, tumors were removed, embedded in OCT, and stained for myc (green) or for an endothelial marker (CD31, red). *A*, B1.8 does not localize in the tumor stroma. It does not localize either associated with vessels (right panel). *B*, 2.15 localizes in the tumor in dispersed clusters of cells (white arrow). A distinct co-staining occurred in the basal side of endothelial cells (arrowhead and right panel).

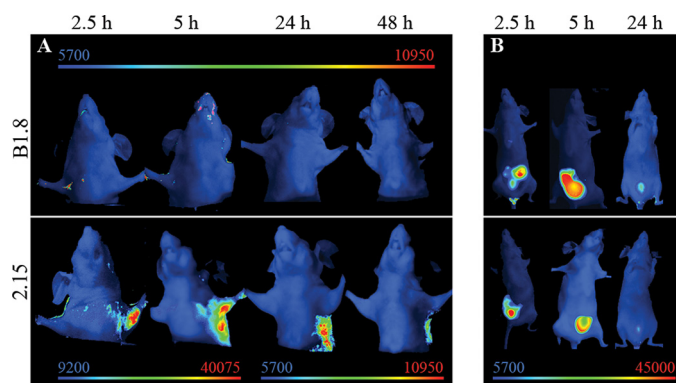


FIGURE 5. Targeting of fluorescently labeled anti-p32 trimerbody to human tumors. Near-infrared fluorescence imaging of nude mice bearing MDA-MB-231 human breast tumor xenografts. *A*, an anti-hapten B1.8 trimerbody did not localize in the tumor, whereas the 2.15 trimerbody showed a rapid (2.5 h) and sustained (up to 48 h) localization. Note the different scale bar for the early images. *B*, ventral view shows similar trimerbody accumulation in the bladder, as well as some elimination through the liver.

markers fail to accumulate in nonproliferating tumors (43). It is tempting to speculate that this can be a major problem in a proportion of patients as well as certain types of tumors with a very low growth rate.

Although p32 has been reported in the surface of several other cell types under certain circumstances (fibroblasts, neutrophils, endothelial cells, platelets, etc. (15)), the majority of the protein is cytoplasmic and is detectable after permeabilization of the cell membrane (44). Nonetheless, certain cells are able to translocate and release the protein, which can result in the modification of a number of cellular and vascular protein responses (15). The role of cell surface p32 in the tumor remains unclear; however, the unique expression pattern of p32 in tumor cells, tumor lymphatics, and tumor-associ-

ated macrophages/myeloid cells makes p32 an ideal target for the diagnosis and therapy of cancer. In fact, it has been reported that p32/gC1qR is the receptor for a tumor-homing peptide, LyP-1. The LyP-1 peptide has been shown to localize in the tumor lymphatics (9), and to effectively target nanoparticles to the tumor (45). In this work, we confirmed that systemically administered 2.15 scFv penetrates the tumor covering a broad population of cells but in a pattern distinct from that of the LyP-1 peptide (8, 9). Although LyP-1 is probably processed as a CendR peptide upon binding to p32 and thus can actively penetrate the tissue (46, 47), the antibody may remain partially bound to the p32 readily accessible from the lumen of the blood vessels and also reach some clusters of cells (probably macrophages) in the stroma nearby.

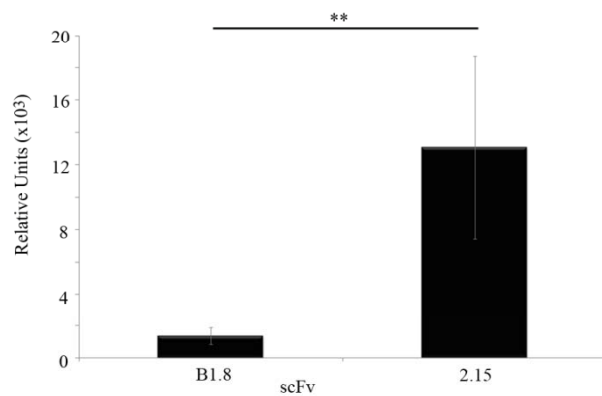
Multimerization of scFv constructs has important advantages for tumor-targeting applications. Trimerbodies are intermediate-sized molecules that exhibit high stability under physiological conditions and enhanced avidity for the target owing to the trivalent structure (6, 48). In fact, we report that the 2.15 antibody in a trimerbody format stained the tumor more brightly than the 2.15 scFv at all time points. Anti-p32 trimerbody localized rapidly and specifically in the tumors. The tumor uptake reached a maximum at 2.5–5 h post injection and slowly washed out over time. Fluorescence was still detectable in the tumor 48 h after the trimerbody inoculation.

In summary, we have demonstrated that the human anti-p32 antibody 2.15 can selectively localize tumors *in vivo*. These results illustrate the potential of this new antibody for imaging and therapeutic applications and suggest that p32 might be universal target for cancer targeting.

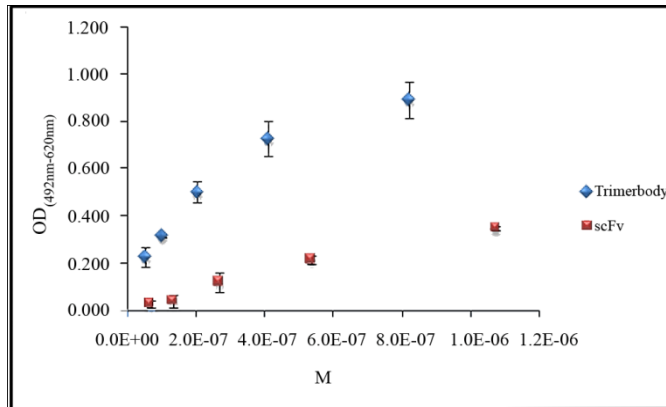
Acknowledgments—We thank Drs. Paloma Sánchez-Mateos and Rafael Samaniego for help with the confocal microscope.

REFERENCES

- Jacobsson, H., Wallin, G., Werner, S., and Larsson, S. A. (1994) *Eur. J. Nucl. Med.* **21**, 582–586
- Nguyen, B. D., Roarke, M. C., Karstaedt, P. J., Ingui, C. J., and Ram, P. C. (2009) *Curr. Probl. Diagn. Radiol.* **38**, 68–83
- Vogel, C. A., Bischof-Delaloye, A., Mach, J. P., Pèlegri, A., Hardman, N., Delaloye, B., and Buchegger, F. (1993) *Br. J. Cancer* **68**, 684–690
- Sanz, L., Kristensen, P., Blanco, B., Facticeau, S., Russell, S. J., Winter, G., and Alvarez-Vallina, L. (2002) *Gene Ther.* **9**, 1049–1053
- Steffen, A. C., Orlova, A., Wikman, M., Nilsson, F. Y., Ståhl, S., Adams, G. P., Tolmachev, V., and Carlsson, J. (2006) *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **33**, 631–638
- Cuesta, A. M., Sánchez-Martín, D., Sanz, L., Bonet, J., Compte, M., Kremer, L., Blanco, F. J., Oliva, B., and Alvarez-Vallina, L. (2009) *PLoS ONE* **4**, e5381
- Buchsbaum, G. M., Moll, C., and Duecy, E. E. (2004) *Int. Urogynecol. J. Pelvic. Floor Dysfunct.* **15**, 432–433
- Laakkonen, P., Akerman, M. E., Biliran, H., Yang, M., Ferrer, F., Karpanen, T., Hoffman, R. M., and Ruoslahti, E. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 9381–9386
- Laakkonen, P., Porkka, K., Hoffman, J. A., and Ruoslahti, E. (2002) *Nat. Med.* **8**, 751–755
- Fogal, V., Zhang, L., Krajewski, S., and Ruoslahti, E. (2008) *Cancer Res.* **68**, 7210–7218
- Krainer, A. R., Mayeda, A., Kozak, D., and Binns, G. (1991) *Cell* **66**, 383–394
- Gupta, S., Batchu, R. B., and Datta, K. (1991) *Eur. J. Cell Biol.* **56**, 58–67
- Ghebrehiwet, B., Lim, B. L., Peerschke, E. I., Willis, A. C., and Reid, K. B. (1994) *J. Exp. Med.* **179**, 1809–1821
- Yu, L., Loewenstein, P. M., Zhang, Z., and Green, M. (1995) *J. Virol.* **69**, 3017–3023
- Eggleton, P., Tenner, A. J., and Reid, K. B. (2000) *Clin. Exp. Immunol.* **120**, 406–412
- Dedio, J., and Müller-Esterl, W. (1996) *FEBS Lett.* **399**, 255–258
- Braun, L., Ghebrehiwet, B., and Cossart, P. (2000) *EMBO J.* **19**, 1458–1466
- Kittleson, D. J., Chianese-Bullock, K. A., Yao, Z. Q., Braciale, T. J., and Hahn, Y. S. (2000) *J. Clin. Invest.* **106**, 1239–1249
- Mahdi, F., Shariat-Madar, Z., Todd, R. F., 3rd, Figueroa, C. D., and Schmaier, A. H. (2001) *Blood* **97**, 2342–2350
- Mahdi, F., Madar, Z. S., Figueroa, C. D., and Schmaier, A. H. (2002) *Blood* **99**, 3585–3596
- Peerschke, E. I., Reid, K. B., and Ghebrehiwet, B. (1994) *J. Immunol.* **152**, 5896–5901
- Eggleton, P., Ghebrehiwet, B., Sastry, K. N., Coburn, J. P., Zaner, K. S., Reid, K. B., and Tauber, A. I. (1995) *J. Clin. Invest.* **95**, 1569–1578
- Kuna, P., Iyer, M., Peerschke, E. I., Kaplan, A. P., Reid, K. B., and Ghebrehiwet, B. (1996) *Clin. Immunol. Immunopathol.* **81**, 48–54
- Peerschke, E. I., Smyth, S. S., Teng, E. I., Dalzell, M., and Ghebrehiwet, B. (1996) *J. Immunol.* **157**, 4154–4158
- Steinberger, P., Szekeres, A., Wille, S., Stöckl, J., Selenko, N., Prager, E., Staffler, G., Madic, O., Stockinger, H., and Knapp, W. (2002) *J. Leukocyte Biol.* **71**, 133–140
- Vegh, Z., Goyarts, E. C., Rozengarten, K., Mazumder, A., and Ghebrehiwet, B. (2003) *International Immunopharmacol.* **3**, 345–357
- Oiki, S., and Okada, Y. (1988) *J. Immunol.* **141**, 3177–3185
- Hawkins, R. E., Russell, S. J., and Winter, G. (1992) *J. Mol. Biol.* **226**, 889–896
- Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, I. M., Waterhouse, P., Crosby, W. L., Kontermann, R. E., Jones, P. T., Low, N. M., and Allison, T. J. (1994) *EMBO J.* **13**, 3245–3260
- Nissim, A., Hoogenboom, H. R., Tomlinson, I. M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D., and Winter, G. (1994) *EMBO J.* **13**, 692–698
- Gibson, T. (1984) *Studies in the Epstein-Barr Virus Genome*, Ph.D. thesis, MRC Laboratory of Molecular Biology, University of Cambridge, Cambridge, UK
- Kristensen, P., and Winter, G. (1998) *Folding Des.* **3**, 321–328
- Sanz, L., Kristensen, P., Russell, S. J., Ramirez García, J. R., and Alvarez-Vallina, L. (2001) *Cancer Immunol. Immunother.* **50**, 557–565
- Retter, I., Althaus, H. H., Münch, R., and Müller, W. (2005) *Nucleic Acids Res.* **33**, D671–674
- Carter, P., Bedouelle, H., and Winter, G. (1985) *Nucleic Acids Res.* **13**, 4431–4443
- Birchler, M., Neri, G., Tarli, L., Halin, C., Viti, F., and Neri, D. (1999) *J. Immunol. Methods* **231**, 239–248
- Lynch, N. J., Reid, K. B., van den Berg, R. H., Daha, M. R., Leigh, L. A., Ghebrehiwet, B., Lim, W. B., and Schwaebler, W. J. (1997) *FEBS Lett.* **418**, 111–114
- Harries, M., and Smith, I. (2002) *Endocr. Relat. Cancer* **9**, 75–85
- Begent, R. H., Verhaar, M. J., Chester, K. A., Casey, J. L., Green, A. J., Napier, M. P., Hope-Stone, L. D., Cushen, N., Keep, P. A., Johnson, C. J., Hawkins, R. E., Hilson, A. J., and Robson, L. (1996) *Nat. Med.* **2**, 979–984
- McDevitt, M. R., Barendsward, E., Ma, D., Lai, L., Curcio, M. J., Sgouros, G., Ballangrud, A. M., Yang, W. H., Finn, R. D., Pellegrini, V., Geerlings, M. W., Jr., Lee, M., Brechbiel, M. W., Bander, N. H., Cordon-Cardo, C., and Scheinberg, D. A. (2000) *Cancer Res.* **60**, 6095–6100
- Neri, D., Carnemolla, B., Nissim, A., Leprini, A., Querzè, G., Balza, E., Pini, A., Tarli, L., Halin, C., Neri, P., Zardi, L., and Winter, G. (1997) *Nat. Biotechnol.* **15**, 1271–1275
- Silacci, M., Brack, S. S., Späth, N., Buck, A., Hillinger, S., Arni, S., Weder, W., Zardi, L., and Neri, D. (2006) *Protein Eng. Des. Sel.* **19**, 471–478
- Birchler, M. T., Thuerl, C., Schmid, D., Neri, D., Waibel, R., Schubiger, A., Stoeckli, S. J., Schmid, S., and Goerres, G. W. (2007) *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **136**, 543–548
- van den Berg, R. H., Prins, F., Faber-Krol, M. C., Lynch, N. J., Schwaebler, W., van Es, L. A., and Daha, M. R. (1997) *J. Immunol.* **158**, 3909–3916
- Karmali, P. P., Kotamraju, V. R., Kastantin, M., Black, M., Missirlis, D., Tirrell, M., and Ruoslahti, E. (2009) *Nanomedicine* **5**, 73–82
- Ruoslahti, E., Bhatia, S. N., and Sailor, M. J. (2010) *J. Cell Biol.* **188**, 759–768
- Teesalu, T., Sugahara, K. N., Kotamraju, V. R., and Ruoslahti, E. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 16157–16162
- Cuesta, A. M., Sainz-Pastor, N., Bonet, J., Oliva, B., and Alvarez-Vallina, L. (2010) *Trends Biotechnol.* **28**, 355–362



Supplementary Figure 1. Comparison of B1.8 scFv and 2.15 scFv in *in vivo* imaging. A region of interest corresponding to the tumour was selected on each image, and the average intensity was calculated using the Hokawo software. Mean \pm SEM (2.15, n=4; B1.8, n=4). One tail student's test (p=0.0087).



Supplementary Figure 2. Comparison of 2.15 as scFv or trimerbody in ELISA. A constant coating of p32 (5 μ g/ml), and a curve of different dilutions shows an enhanced binding in the trimerbody format as compared to the scFv. The concentration refers to the molar concentration of the monomers (although all the single-chain monomers would exist only as part of a trimer at the concentrations used).